**ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO, FLUXO DE PÓLEN E TAXA
DE CRUZAMENTO EM *Bauhinia forficata* Link.
(Caesalpiniaceae)**

ELZA MARIA GUTMARÃES SANTOS
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador : Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração :
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA .
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Santos, Elza Maria Guimarães
S237e Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de
cruzamento em *Bauhinia forficata* Link.
(Caesalpiniaceae). Piracicaba, 1994.
114p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Ecologia florestal 2. Mororó - Cruzamento
3. Mororó - Polinização I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.973323

**ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO, FLUXO DE PÓLEN E TAXA
DE CRUZAMENTO EM *Bauhinia forficata* Link.
(Caesalpiniaceae)**

ELZA MARIA GUTMARÃES SANTOS

Aprovada em : 29.11.1994

Comissão julgadora :

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Sodero Martins

ESALQ/USP

Prof. Dr. Edson Seizo Mori

FCA/UNESP

**Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama
Orientador**

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama pela orientação e por ter me concedido a oportunidade de realizar este trabalho;
- Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky pelas valiosas sugestões e auxílio nas análises biométricas;
- Ao Prof. José Augusto Piratelli pelo auxílio na coleta dos exemplares de Chiroptera;
- Ao Prof. Dr. Keith Brown pela identificação dos exemplares de Lepidoptera;
- Ao especialista Wagner André Pedro pela identificação dos exemplares de Chiroptera;
- Ao Departamento de Entomologia da ESALQ/USP e João Ângelo Cerignoni, pela identificação dos exemplares de Lepidoptera e Hymenoptera;
- Ao Sr. Gonçalo Mariano pelo auxílio na localização das árvores na Estação Ecológica de Ibicatu;
- Ao colhedor de sementes Leonardo de Souza pela prestatividade durante a realização das coletas;
- Ao IPEF-ESALQ/USP por ter cedido um funcionário para coleta das sementes utilizadas neste trabalho;
- Ao Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo pela permissão para realização do tra-

balho na Estação Ecológica de Ibicatu, Piracicaba (SP);

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

- Aos docentes do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP pela importante contribuição na minha formação profissional;

- A Léia, secretária do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por sua dedicação e prestatividade;

- A Sueli Penteado pela sua colaboração em diversas etapas, especialmente no trabalho de campo;

- A Elza Martins Ferraz, pela sua colaboração durante as análises de eletroforese e pelo apoio pessoal e amizade no decorrer deste trabalho;

- Ao Flávio pelas sugestões finais e por sua amizade;

- A todos os alunos de graduação e pós-graduação que me auxiliaram em vários momentos durante o desenvolvimento do trabalho;

- Aos amigos Gabi e Maurício que sempre estiveram ao meu lado, colaborando intensamente em todos os momentos profissionais e pessoais;

- Ao Luiz, meu marido, pelo companheirismo com que compartilhou todos esses momentos comigo e, especialmente, pelo reconhecimento e valorização do meu trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Características gerais de <i>Bauhinia</i> <i>forficata</i> Link.....	5
2.2. Quiropterofilia em espécies neotropicais.....	10
2.2.1. Quiropterofilia no gênero <i>Bauhinia</i>	14
2.3. Fluxo de pólen.....	18
2.3.1. Considerações gerais sobre fluxo gênico...	18
2.3.2. Metodologias para estimar fluxo gênico...	23
2.3.3. Dispersão de pólen em espécies zoófilas..	26
2.3.4. Metodologias para avaliar o fluxo de pólen.....	31
2.4. Aspectos gerais do sistema reprodutivo de espécies arbóreas.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Local e população de estudo.....	38
3.2. Avaliação da ecologia da polinização.....	39
3.3. Medidas do fluxo de pólen.....	42
3.4. Análises eletroforéticas.....	45
3.5. Análise dos dados isoenzimáticos.....	50

3.5.1. Estimativa da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$).....	52
3.5.2. Estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$).....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Avaliação da ecologia da polinização.....	58
4.1.1. Análise da biologia floral.....	58
4.1.2. Análise dos visitantes florais.....	63
4.2. Avaliação do fluxo de pólen.....	70
4.3. Avaliação do sistema reprodutivo.....	74
4.3.1. Estimativa da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$).....	82
4.3.2. Estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$).....	88
4.4. Implicações das características da biologia reprodutiva de <i>Bauhinia forficata</i>	91
5. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
APÊNDICE.....	109

ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO, FLUXO DE PÓLEN E TAXA DE
CRUZAMENTO EM *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae)

Autora: Elza Maria Guimarães Santos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

RESUMO

A ecologia da polinização, dispersão de pólen e sistema de cruzamento de *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae) foram estudados em uma área de vegetação secundária, localizada na Estação Ecológica de Ibicatu. As flores de *Bauhinia forficata* são hermafroditas e mostram características da síndrome de quiropterofilia, tais como: flores brancas, antese noturna, flores expostas acima da folhagem e grande produção de néctar e pólen.

Esta espécie é polinizada por *Carollia perspicillata* uma espécie de quiróptero que visita as flores numa estratégia do tipo linha-de-captura. A transferência de pólen foi avaliada utilizando-se pó fluorescente como marcador, e a distância de dispersão de pólen observada, foi além de 200 metros da planta marcada.

O modelo multiloco de cruzamento misto foi utilizado para analisar o sistema de cruzamento. A média

das estimativas da taxa de cruzamento para os locos individuais ($\hat{t}_s$) foi de 0,916 e a estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$) foi de 0,982 indicando que esta espécie é predominantemente alógama.

Por outro lado as estimativas obtidas a partir da análise de variância mostram um coeficiente de endogamia ($\hat{f}$) de 0,1098 e uma taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$) de 0.8021, revelando que a fecundação cruzada é predominante, mas baixos níveis de endogamia podem estar ocorrendo. A comparação entre as diferentes estimativas de taxa de cruzamento sugere a existência de cruzamento entre indivíduos aparentados.

O comportamento do polinizador, o fluxo de pólen à longa distância e a alta taxa de cruzamento parecem ser características importantes nos processos de colonização desta espécie, podendo levar a um aumento da variabilidade genética nas populações recém estabelecidas.

POLLINATION ECOLOGY, POLLEN FLOW AND OUTCROSSING RATE IN
Bauhinia forficata Link. (Caesalpinaceae)

Author : Elza Maria Guimarães Santos

Adviser : Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

SUMMARY

The pollination ecology, pollen dispersal and mating system of *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae) were studied in a secondary vegetation at "Estação Ecológica de Ibicatu". The flowers of *Bauhinia forficata* are hermaphrodite and show chiropterophilous syndrome traits such as whitish colour, nocturnal anthesis, flowers placed outside the foliage and a great production of pollen and nectar.

This species is pollinated by *Carollia perspicillata*, a bat which forages in a "trap-line" mode. The pollen carryover was evaluated using powdered fluorescent dyes as marker, and the mean distance of pollen dispersal from an individual plant was greater than 200 meters.

A multilocus mixed mating model was used to analyse the mating system. The mean single locus estimate

of outcrossing ($\hat{t}_s$) was 0,916 and the multilocus outcrossing estimate ($\hat{t}_m$) was 0,982, indicating that this species is mainly outcrossed.

However, an inbreeding coefficient ($\hat{f}$) of 0,1098 and an average outcrossing rate ($\hat{t}_a$) of 0,8021, estimated by analysis of variance, indicate that outcrossing is prevalent, but low levels of inbreeding may be occurring. The comparison of estimates of outcrossing rates suggests existence of related mating.

The behaviour of pollinator, long distance pollen flow, and high outcrossing rate appear to be important traits for this species in the colonization process, might lead to increase genetic variability of the new populations.

1 . INTRODUÇÃO

Bauhinia forficata Link. é uma espécie arbórea que apresenta-se distribuída nos mais variados tipos de vegetação, ocorrendo na Floresta Tropical Atlântica (KLEIN, 1979), nas florestas mesófilas (CORRÊA, 1984) e na vegetação semi-árida do Nordeste (SCHACHT, 1992), e em diversos tipos de habitats tais como margens de rios, capoeiras, borda de fragmentos florestais, pastos e beiras de estradas.

As plantas de *Bauhinia forficata* apresentam desenvolvimento rápido, atingindo cerca de 1 metro aos 14 meses de idade, quando já apresentam florescimento e frutificação. Com quatro anos atingem cerca de três a quatro metros de altura, tendo a copa bem formada, abundante florescimento e produção de grande quantidade de frutos, apresentando inclusive um grande potencial ornamental (BELTRATI & PAOLI, 1989). Devido ao seu rápido crescimento e reprodução, os autores mencionados ressaltam

que *Bauhinia forficata* é uma espécie de grande potencial para utilização em programas de reconstituição de matas.

Os programas de reconstituição e implantação de florestas vêm assumindo atualmente, uma posição de destaque (KAGEYAMA et alii, 1989; KAGEYAMA & CASTRO, 1988), especialmente no interior do Estado de São Paulo, que apresenta suas florestas quase que totalmente fragmentadas em pequenos remanescentes de floresta mesófila (MORELLATO, 1992; COSTA, 1992).

KAGEYAMA et alii, (1989) ressaltam que, para a recomposição da vegetação original, é necessário se considerar não apenas a composição florística e fitossociológica da floresta, mas também a estrutura genética das populações de espécies envolvidas, visando a manutenção da biodiversidade e da variabilidade genética.

Atualmente vários estudos têm sido conduzidos no sentido de se obter informações sobre a biologia reprodutiva e estrutura genética de espécies tropicais. Entretanto, o conhecimento sobre o sistema reprodutivo das espécies vegetais e as complexas interações planta-animal nos ecossistemas tropicais tiveram impulso somente há duas décadas (JANZEN, 1971; BAWA, 1974; FRANKIE & BAKER, 1974).

Neste contexto, HAMRICK (1987) demonstra que o sistema reprodutivo e os mecanismos de polinização têm

forte influência sobre a distribuição da variação genética em plantas, sendo que as espécies autógamas apresentam baixa variabilidade dentro das populações e alta variabilidade entre as populações, enquanto que as espécies alógamas, especialmente as anemófilas, apresentam padrão oposto, ficando as espécies de fecundação cruzada e polinizadas por animais em níveis intermediários entre estes dois extremos.

Outro aspecto ressaltado por MARTINS (1984) refere-se ao fato das espécies colonizadoras oferecerem excelente material de estudo na área de biologia de populações, sendo que, entre as inúmeras famílias de plantas tropicais, Leguminosae oferece material adequado para estudos experimentais nesta área, especialmente em relação às estratégias adaptativas utilizadas na colonização de habitats abertos ou alterados pelo homem.

Considerando que *Bauhinia forficata* é uma leguminosa arbórea, de rápido desenvolvimento, reprodução precoce e frequentemente encontrada em ambientes instáveis, procurou-se avaliar neste trabalho alguns aspectos da biologia reprodutiva desta espécie, que permitissem uma melhor compreensão dos mecanismos que lhe garantem eficiência na ocupação de ambientes tão diversos, especialmente na colonização de áreas perturbadas.

Para elucidar alguns aspectos desta questão,

o presente trabalho teve como objetivos:

a. estudar a ecologia da polinização, visando identificar o polinizador de *Bauhinia forficata* e seu comportamento;

b. avaliar o fluxo de pólen em relação a distância de transporte dos grãos de pólen e a sua distribuição entre as plantas dentro da população e,

c. estimar a taxa de cruzamento da população de *Bauhinia forficata* estudada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais de *Bauhinia forficata* Link.

Bauhinia forficata Link. é uma leguminosa que pertencia originalmente à família Leguminosae, sub-família Caesalpinoidea. Entretanto, segundo a classificação recente de CRONQUIST (1981), a espécie passa a pertencer à família Caesalpiniaceae. A espécie está classificada na seção *Pauletia* dentro do gênero *Bauhinia* e possui dois sinônimos científicos, *Bauhinia aculeata* Vell. e *Bauhinia brasiliensis* Vog. (CORRÊA, 1984).

O gênero *Bauhinia* é pré-lineano e foi descrito em 1703 por Charles Plumier. A partir do século XIX começaram as divergências entre os taxonomistas, alguns adotando o conceito clássico e amplo de *Bauhinia* e outros fundando gêneros afins, que seriam reconhecidos mais tarde como seções do referido gênero (VAZ, 1979).

Finalmente, BENTHAN (1870) manteve o sentido amplo de *Bauhinia*, dividindo as espécies brasileiras em três seções. Uma delas, a seção *Pauletia* (Cav.) DC, abrange as espécies não escandentes arbustivas e arbóreas, incluindo *Bauhinia forficata*. As outras duas seções

Schnella e *Tylotaea* incluem espécies escandentes, lianas e arbustos, sendo que a maioria das espécies da seção *Tylotaea* ocorre na Floresta Pluvial Tropical Amazônica, com forte endemismo (VAZ, 1979).

Bauhinia forficata é conhecida popularmente como pata-de-vaca, pata-de-boi, unha-de-vaca, unha-de-boi e mororó, e se caracteriza como uma espécie arbórea de 6 a 9 metros de altura, chegando a medir, segundo KLEIN (1979), cerca de 15 metros no interior da floresta. Apresenta ramos frágeis ou pendulares; folhas de 8 a 10 centímetros de comprimento, divididas acima do meio, ovais ou lanceoladas e glabras nas duas faces, e possui acúleos que podem ser retos ou levemente curvos, conforme a descrição de CORRÊA (1984).

As inflorescências são racemos simples. Suas flores são hermafroditas, com cerca de 8 centímetros de comprimento, o cálice é gamossépalo, a corola dialipétala, com cinco pétalas brancas, dez estames, ovário súpero, linear, pubescente e estipitado. O fruto é um legume perfeito de 15 a 20 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura (CORRÊA, 1984).

A espécie *Bauhinia forficata* tem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo (CORRÊA, 1984), Ceará (SCHACHT, 1992), Paraná, Santa Catarina e em outros países

da América Latina como Paraguai, Peru, Bolívia, Uruguai e Argentina (REZENDE, 1987).

Além de sua ampla distribuição geográfica, *Bauhinia forficata* ocorre em habitats bastante variados. Segundo levantamento fornecido pelo Prof. Ademir Reis (curador do Herbário "Barbosa Rodrigues" - HBR) a espécie ocorre nos estados de Santa Catarina e Paraná em áreas de capoeira (com indivíduos variando de 3 a 10 metros de altura), de floresta (indivíduos de 15 metros de altura), beiras de estradas e margens de rios (indivíduos de cerca de 2 até 8 metros de altura) .

Adicionalmente, KOTCHETKOFF-HENRIQUES e JOLY (1988) demonstraram a ocorrência de *Bauhinia forficata* em encosta de forte declividade à margem do rio da Cachoeira (Itirapina, SP), onde a espécie está entre as mais frequentes. Esta área, apesar de não apresentar perturbações antrópicas, está sujeita à constantes deslizamentos, o que restringe o número de espécies que ali conseguem se manter.

Quanto à biologia reprodutiva de *Bauhinia forficata*, alguns estudos importantes têm sido realizados enfocando especialmente os aspectos relacionados às sementes e formas alternativas de propagação.

No que se refere à germinação das sementes de *Bauhinia forficata*, BELTRATI e PAOLI (1989) avaliaram

alguns aspectos relativos à luminosidade e permeabilidade do tegumento. Os resultados obtidos demonstraram que as sementes apresentam uma acentuada impermeabilidade à água, pois só germinaram após escarificação mecânica. Os autores também observaram indiferença ao fator luz, ocorrendo 100% de germinação no claro e 96% no escuro.

Com relação à dispersão de sementes de *Bauhinia forficata*, BELTRATI & PAOLI (1989) também verificaram que ocorre por autocoria, através da abertura do fruto em duas valvas lenhosas, que se enrolam helicoidalmente.

Além da reprodução por sementes, *Bauhinia forficata* apresenta também propagação vegetativa. Este tipo de reprodução ocorre através de raízes gemíferas, que apresentam brotamentos até três metros de distância da planta mãe, ou seja, do tronco principal (RODRIGUES et alii, 1990). Tal estudo foi realizado em uma floresta mesófila estacional semi-decídua, 5 meses após a incidência de fogo, evidenciando também a capacidade de sobrevivência da espécie mesmo em áreas frequentemente sujeitas à queimadas, podendo também representar uma estratégia alternativa para a espécie na colonização de novas áreas.

Os aspectos mencionados anteriormente, tais como: capacidade de colonização de áreas perturbadas (RODRIGUES et alii, 1990; HBR), sementes com dormência de

tegumento devido à impermeabilidade à água e dispersão autocórica (BELTRATI & PAOLI, 1989), sugerem que a espécie possa se enquadrar no conceito de pioneira antrópica descrito por KAGEYAMA et alli (1992), que são "espécies não tipicamente pioneiras na floresta primária e que fazem o papel de pioneiras na sucessão em áreas antrópicas".

Dados da fenologia das espécies arbóreas do Bosque dos Jequitibás (Campinas, SP), obtidos por MATTHES (1980), demonstram que *Bauhinia forficata* apresentou floração contínua do início de agosto ao final de dezembro, apresentando frutos maduros desde o início de março até o final de novembro, no ano de 1978. Entretanto, no ano de 1977, a espécie apresentou floração somente nos meses de novembro e dezembro, e frutos maduros de junho a agosto, mostrando portanto uma variação no padrão fenológico entre anos.

Em relação à polinização, FAEGRI e PIJL (1979) ressaltam que as características das flores, quando analisadas em conjunto, mostram que certas combinações produzem um determinado tipo de flor, ao qual está associado um mecanismo de polinização definido, caracterizando uma síndrome específica.

Com base na literatura, verificou-se que certas características das flores de *Bauhinia forficata* enquadram-se na síndrome de quiropterofilia (polinização

por morcegos), tais como: flores brancas, grandes, expostas acima da folhagem e localizadas em inflorescências terminais do tipo racemo. Adicionalmente, FAEGRI & PIJL (1979) acrescentam que as espécies do gênero *Bauhinia* apresentam flores com grandes quantidades de pólen, sendo esta outra característica importante da síndrome de quiropterofilia.

É importante salientar ainda que várias espécies do gênero *Bauhinia*, que apresentam características florais semelhantes às descritas para *Bauhinia forficata*, são polinizadas por morcegos. Entre elas encontram-se *Bauhinia benthamiana* (RAMIREZ et alii, 1984), *Bauhinia pauletia* (HEITHAUS et alii, 1974), *Bauhinia multinervia* (HOKCHE & RAMIREZ, 1990), *Bauhinia rufa* (SAZIMA & SAZIMA, 1978) e *Bauhinia bongardii* (BERGALLO, 1990).

2.2. Quiropterofilia em espécies Neotropicais

Nas regiões tropicais, cerca de 750 espécies de plantas apresentam atributos florais que favorecem a polinização por mamíferos, sendo que os morcegos constituem o grupo de mamíferos mais importante como visitantes e polinizadores de flores. Entre as famílias de plantas das regiões neotropicais, adaptadas à polinização por morcegos (quiropterófilas), destacam-se as agaváceas, bignoniáceas,

bombacáceas, bromeliáceas, cactáceas, gesneriáceas, leguminosas, musáceas e solanáceas (GRIBEL et alii, 1990).

De acordo com FAEGRI e PIJL (1979), a Síndrome de Polinização pode ser entendida como o conjunto de características morfológicas e fisiológicas das flores que estão relacionadas com os hábitos e a morfologia dos polinizadores.

Dentre as características envolvidas na síndrome de quiropterofilia, GRIBEL et alii (1990) destacam que as flores das plantas polinizadas por morcegos apresentam antese crepuscular ou noturna em função do horário de atividade dos morcegos e, em algumas espécies as flores duram somente uma noite; a coloração das flores está associada à orientação dos morcegos à curta distância e, geralmente é branca ou creme e o odor, na maioria das espécies, é forte e desagradável ao olfato humano (semelhante à fermentação), sendo importante para que os morcegos possam localizar as flores a longa distância.

A produção de néctar, em espécies quiropterófilas, geralmente é intensa se comparada à de flores polinizadas por insetos. BAKER (1978), ressalta que a quantidade de recompensa oferecida à um visitante floral depende também da concentração de açúcares no néctar, sendo que esta varia consideravelmente de espécie para espécie e mostra uma clara relação com a natureza do polinizador

predominante. O autor verificou concentrações de açúcar de cerca de 11% em espécies das famílias Bombacaceae e Capparidaceae, ambas polinizadas por morcegos.

A quantidade de pólen nas espécies quiropterófilas é grande, apresentando geralmente muitos estames ou anteras aumentadas, sendo essa característica evidenciada em *Ceiba*, *Bauhinia*, *Agave* e outros gêneros, favorecendo a deposição de volumosa carga de pólen no corpo do morcego, cujos pelos apresentam uma grande capacidade de transporte (FAEGRI & PIJL, 1979; GRIBEL et alii, 1990).

Conforme GRIBEL et alii (1990), as flores são expostas destacando-se da folhagem, o que favorece a aproximação do morcego em voo. Algumas são terminais, sobressaindo-se da copa, como no caso da dedaleira (*Lafoensia*), do pequi (*Caryocar*) e do imbiruçu (*Pseudobombax*). Outras são cauliflórias, como no caso da cuieira (*Crescentia*) e outras são flagerifólias, dispostas em longos pedúnculos.

Com relação à quiropterofilia, BAWA (1990) observa que exemplos de polinização por morcegos podem ser encontrados em várias famílias de plantas tropicais, mas são particularmente comuns, ou bem estudados, em Bombacaceae, Passifloraceae, Mimosaceae e Caesalpiniaceae. O autor menciona que as interações planta-polinizador em florestas tropicais oferecem oportunidades únicas para

elucidar vários problemas de interesse evolutivo e ecológico.

Em Bombacaceae, BAKER (1978) realizou um estudo em uma floresta tropical da Costa Rica, verificando que a espécie *Ochroma pyramidale* é polinizada por morcegos. Do mesmo modo, FISCHER et alii (1992) estudaram duas espécies de Bombacaceae na Floresta Tropical Atlântica, *Pseudobombax grandiflorum* e *Bombacopsis calophylla*, e verificaram que ambas são polinizadas pelas mesmas espécies de morcegos, sendo que o fato destas duas espécies simpátricas apresentarem os mesmos polinizadores pode ser explicado parcialmente pela floração assincrônica entre elas. Os autores discutem também que esta assincronia contribui para a manutenção dos morcegos visitantes das flores na área de estudo ao longo de todo o ano, através da oferta contínua de alimento.

Em Passifloraceae, SAZIMA & SAZIMA (1978) observaram duas espécies de morcegos visitando as flores de *Passiflora mucronata*. As duas espécies de morcegos são *Glossophaga soricina* e *Carollia perspicilata* e, apesar de ambas apresentarem tamanho compatível com as estruturas da flor, o papel de *C. perspicilata* como polinizador é questionado pelos autores devido à baixa frequência de visita desta espécie. Além disso, os autores observaram que *G. soricina* apresenta estratégia de "trap-liner", que

favorece a fecundação cruzada. O modo de visita designado "trap-line", ou "linha-de-captura", implica que um determinado morcego visita as flores de plantas dispersas ao longo de sua rota noturna, durante o período de alimentação (SAZIMA & SAZIMA, 1975 ; SAZIMA & SAZIMA, 1978).

Outro exemplo de quiropterofilia em Passifloraceae, na espécie *Tetrastylis ovalis*, foi observado por BUZATO & FRANCO (1992).

As leguminosas, de um modo geral, especialmente as da família Mimosaceae e Caesalpiniaceae, apresentam várias espécies quiropterófilas. Em Mimosaceae, CARVALHO (1960) relata a ocorrência de quiropterofilia em *Parkia gigantocarpa* e PRANCE (1985) em *Parkia pendula*, na floresta tropical da Amazônia.

Em Caesalpiniaceae, além das espécies *Hymenaea courbaril* e *H. stilbocarpa* (CARVALHO, 1960; CRESTANA et alii, 1985), há um grande número de espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia* que são polinizadas por morcegos, como será visto à seguir.

2.2.1. Quiropterofilia no gênero *Bauhinia*

HOKCHE & RAMIREZ (1990) avaliaram a ecologia da polinização de sete espécies do gênero *Bauhinia*,

pertencentes à duas seções: *Pauletia*, que inclui árvores, e *Tylotaea*, que inclui lianas, e verificaram que as espécies da seção *Tylotaea* apresentam flores diurnas, pequenas, de cores bastante variadas e são visitadas por várias espécies de insetos e pássaros, enquanto que as espécies da seção *Pauletia* apresentam flores comparativamente grandes, brancas, com antese noturna e são polinizadas por morcegos.

Com base nestas observações, HOKCHE & RAMIREZ (1990) concluem que os caracteres florais, bem como os animais envolvidos na polinização, estão associados com as diferentes formas de vida das espécies (árvores ou lianas) e com as designações subgenéricas das espécies de *Bauhinia* estudadas. Deste modo, a concordância entre as características reprodutivas e taxonômicas podem estar relacionadas aos padrões evolutivos ao nível de seção.

Duas espécies pertencentes à seção *Pauletia*, *Bauhinia pauletia* e *Bauhinia benthamiana* são quiropterófilas e autocompatíveis, sendo ambas polinizadas pelas mesmas espécies de morcegos filostomídeos, *Phyllostomus discolor* e *Glossophaga soricina* (HEITHAUS et alii, 1974 e RAMIREZ et alii, 1984).

Embora *Bauhinia pauletia*, estudada por HEITHAUS et alii (1974), seja auto-compatível, a autopolinização das flores é improvável, pois há uma correlação entre a deposição de pólen nos estigmas e a atividade dos

morcegos, sugerindo que o movimento de pólen depende basicamente do transporte animal. Os autores citados descrevem duas estratégias na alimentação de néctar em *Bauhinia pauletia*. Em uma das estratégias, morcegos grandes, como *Phyllostomus discolor*, visitam em grupos, pousam e permanecem por um tempo relativamente longo esgotando todo o néctar das flores; o movimento de grupos de uma área para outra promove a fecundação cruzada. Em uma segunda estratégia, morcegos pequenos como *Glossophaga soricina*, realizam visitas solitárias e rápidas pairando em frente às flores, visitando uma série de flores repetidamente e diminuindo a probabilidade de autogamia.

Uma outra espécie pertencente ao gênero *Bauhinia* que também apresenta polinização por morcegos é *Bauhinia rufa*, referida por SAZIMA & SAZIMA (1978).

BERGALLO (1990) estudou a polinização de *Bauhinia bongardii* na floresta amazônica e verificou que esta espécie também é polinizada por morcegos. Dentre as espécies de morcegos coletadas, apenas três *Anoura geoffroyi*, *Choeroniscus minor* e *Lonchophylla* sp, apresentavam atributos morfológicos que favoreciam a tomada de néctar e pólen. Entretanto, outras duas espécies consideradas primariamente frugívoras, *Carollia perspicillata* e *Sturnina lilium*, foram observadas alimentando-se de néctar, o que levou o autor a crer que

poderiam estar utilizando as flores de *Bauhinia bongardii*, especialmente pelo fato de essas duas espécies de morcego já terem sido observadas alimentando-se do néctar de outras espécies de plantas (HEITHAUS et alii, 1975; SAZIMA, 1976; SAZIMA & SAZIMA, 1978).

Na literatura encontramos casos de quiropterofilia em espécies de diferentes famílias botânicas, que ocorrem em diversos tipos de vegetação, variando desde florestas tropicais até cerrado. Neste sentido, os morcegos são polinizadores que apresentam características peculiares em relação ao comportamento de visita e à distância de voo, que influenciam direta ou indiretamente as taxas de alogamia das espécies vegetais por eles polinizadas (HEITHAUS et alii, 1974; SAZIMA & SAZIMA 1975; HEITHAUS & FLEMING, 1978).

SAZIMA & SAZIMA (1975) sugerem ainda que alguns morcegos antófilos podem adotar dois tipos distintos de estratégias alimentares; as visitas em grupo e a visita solitária em linhas-de-captura, sendo que estes dois tipos de visita parecem estar mais relacionados com a quantidade de alimento disponível do que com a especialização alimentar dos visitantes. Mas, embora com comportamentos distintos, HEITHAUS et alii (1974) ressaltam que, tanto as visitas em grupos como as visitas solitárias em linhas-de-captura, promovem a fecundação cruzada das plantas vi-

sitadas.

2.3. FLUXO DE PÓLEN

O fluxo gênico têm sido amplamente discutido em relação à sua magnitude e influência sobre a estrutura genética das populações. Em plantas, a transferência de genes pode ocorrer tanto pelo movimento de gametas (pólen) quanto pelo movimento de organismos individuais (sementes, macrófitas, rizomas e estolões).

2.3.1. Considerações gerais sobre fluxo gênico

Fluxo gênico é definido por FUTUYMA (1992) como o intercruzamento entre indivíduos de uma população local e imigrantes de outras populações, sendo que a taxa de fluxo gênico m_{ij} de uma população j para uma população i é a proporção de indivíduos que se reproduzem na população i , que imigraram da população j , naquela geração.

O mesmo autor descreve, também, quatro modelos de fluxo gênico, sendo eles: (i) o de "continente-ilha", no qual ocorre um movimento de genes unidirecional de uma população grande para outra menor e isolada; (ii) o modelo de "ilhas", no qual a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações; (iii) o de "alpondras" ("stepping-stone"), em que cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas e, (iv) o de "isolamento pela distância", no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua.

KAGEYAMA (1987) relata que o conhecimento da biologia reprodutiva em espécies arbóreas tropicais é de extrema importância, especialmente no que se refere à dispersão de pólen e sementes, que apresentam interações bastante complexas, estando diretamente relacionadas ao fluxo gênico.

Além disto, FENSTER (1991b) ressalta que o fluxo gênico depende não somente da distância de dispersão dos genes, através dos vetores de dispersão de pólen e sementes, mas também das vantagens seletivas ou desvantagens que eles conferem aos indivíduos, pois o estabelecimento irá depender do vigor e da viabilidade do zigoto.

A importância do fluxo gênico como força homogeneizadora entre populações de espécies foi amplamente discutida e questionada por EHRLICH & RAVEN (1969) e GRANT (1980).

EHRLICH & RAVEN (1969) argumentam que a seleção é a força de coesão e disrupção mais importante na evolução, e que o regime seletivo em si determina qual influência o fluxo gênico (ou o isolamento) irá ter. Para sustentar essa argumentação, os autores apresentam uma série de estudos mostrando que: (i) o fluxo gênico na natureza é muito mais restrito do que comumente se pensava, (ii) populações que estão completamente isoladas por longos períodos frequentemente mostram pequenas diferenciações, e (iii) populações que trocam genes livremente, mas estão sob diferentes regimes seletivos, podem mostrar diferenciações marcantes.

GRANT (1980) questiona as considerações feitas em relação a restrição do fluxo gênico e considera a existência de algumas falhas no argumento de EHRLICH & RAVEN (1969), pois eles enfatizam a dispersão à curta distância e desprezam os eventos de dispersão à longa distância. O autor enfatiza que há dois segmentos das curvas de distância de dispersão, que podem ser considerados como os mais significativos em termos de fluxo gênico. Estes segmentos são chamados, pelo autor, de: (c) que corresponde à "cauda" da curva representando o registro das distâncias máximas de dispersão, e (d) que corresponde aos eventos desconhecidos e não registrados de dispersão à longa distância, que vão além da área de estudo.

Adicionalmente, GRANT (1980) ressalta que EHRLICH & RAVEN (1969) argumentam com base em dados de dispersão de uma única geração, não considerando a dispersão através do tempo, sendo que as distâncias de dispersão são acumulativas com o tempo, podendo resultar em longas distâncias de dispersão através dos anos.

Além disso, MARTINS (1987) refere outra possibilidade de fluxo gênico no tempo, que pode ocorrer através da germinação diferencial das sementes armazenadas no solo, que constituem o banco de sementes. O autor citado ressalta que a ocorrência de dormência nas sementes de algumas espécies, levando à formação de um banco, gera uma sobreposição de gerações sucessivas, podendo funcionar como um mecanismo de fluxo gênico no tempo.

Uma ampla revisão sobre fluxo gênico em plantas é apresentada por LEVIN & KERSTER (1974), contendo um conjunto de informações sobre o comportamento de visita dos polinizadores e consequente fluxo de pólen em plantas zoófilas, fluxo de pólen em plantas anemófilas, dispersão de sementes e fluxo gênico. Neste estudo os autores citados distinguem as considerações entre "fluxo gênico potencial", que é considerado como a deposição de pólen e sementes à partir de uma população fonte, em função da distância, e o "fluxo gênico efetivo", que se refere à incidência de fertilização (no caso de pólen) e ao estabelecimento de indivíduos reprodutivos (no caso de sementes), como uma função da distância da população fonte.

De acordo com LEVIN & KERSTER (1974), podem haver grandes diferenças entre o fluxo gênico potencial e o efetivo. No entanto, as avaliações sobre o movimento de pólen e sementes fornecem valiosas informações para o entendimento da dispersão de genes na natureza, especialmente na ausência de marcadores genéticos apropriados e do conhecimento das frequências gênicas.

2.3.2. Metodologias para estimar fluxo gênico

Atualmente, há uma série de metodologias diferentes para se estimar fluxo gênico. Entretanto, grande parte delas depende de algumas características específicas que muitas vezes não estão presentes na espécie de interesse, restringindo portanto sua aplicação. Com a utilização da técnica de eletroforese de isoenzimas, houve uma ampliação das metodologias disponíveis, com a vantagem que os dados de isoenzimas podem ser obtidos para qualquer espécie.

Uma metodologia relativamente simples é comparar as frequências genotípicas de plantas jovens com as da geração adulta. Entretanto, variações na frequência genotípica podem ser devidas a vários fatores evolutivos, especialmente cruzamentos não aleatórios e seleção. Portanto, se estes parâmetros não forem quantificados, não

é possível estimar, individualmente, o efeito do fluxo gênico sobre a composição genética das populações (HAMRICK, 1987).

Outras metodologias bastante utilizadas para estimar fluxo gênico, em plantas, consistem em acompanhar o movimento dos vetores de dispersão (de pólen e sementes), das unidades de dispersão ou de genes marcadores (HAMRICK, 1987). O acompanhamento dos agentes de dispersão têm a vantagem que os movimentos podem ser seguidos em várias plantas dentro da população. Entretanto, o acompanhamento da movimentação destes componentes entre populações é bastante difícil de ser realizado.

Seguir o movimento real do pólen e da semente em vez de seus vetores é mais difícil, mas pode ser realizado pela marcação de pólen ou sementes com pós coloridos, elementos radioativos, ou medindo a deposição de pólen e sementes ao redor de indivíduos isolados (HAMRICK, 1987). Entretanto, esta metodologia só é válida para estimar fluxo gênico, se for possível seguir estes componentes entre populações.

Marcadores genéticos têm sido utilizados com sucesso em populações estabelecidas artificialmente (HANDEL, 1982; HANDEL & MISHKIN 1984), mas também existem limitações por ser difícil estabelecer, em populações artificiais, as mesmas características das populações

naturais (densidade, dispersão, estrutura de tamanho, polinizadores, etc.)

Recentemente, algumas metodologias, utilizando dados de isoenzimas, têm sido desenvolvidas para medir o movimento de genes, entre elas encontra-se a de SLATKIN (1985), que apresenta uma estimativa do nível médio de fluxo gênico, obtida através do número médio de migrantes transferidos entre populações locais (Nm); onde N é o tamanho da população e m é a fração de imigrantes. Segundo o autor, o logaritmo de Nm está aproximadamente linearmente relacionado ao logaritmo da frequência média de alelos "raros" (alelos que aparecem somente em uma população). Entretanto, esta metodologia tem sido pouco utilizada para se estimar fluxo gênico em plantas.

Uma outra metodologia que vem sendo utilizada recentemente é a análise de paternidade, que fornece uma descrição detalhada da estrutura reprodutiva da população. A resolução desta metodologia é dependente do número de locos polimórficos, do número de alelos por locos, da frequência destes alelos e do número de pais potenciais. Uma vez que o pai de cada progênie está identificado, os padrões de movimento de pólen dentro da área de estudo podem ser determinados, e a proporção de pólen efetivamente oriundo de fora da área de estudo pode ser identificada (ELLSTRAND & MARSHALL, 1985; GODT &

HAMRICK, 1993; BROYLES & WYATT, 1991). Além disto, DEVLIN & ELLSTRAND (1990) colocam que a análise de paternidade tem, ainda, a vantagem de fornecer uma medida direta da transferência de gametas entre populações, fornecendo portanto estimativas das taxas de fluxo gênico.

2.3.3. Dispersão de pólen em espécies zoófilas

Há uma série de estudos mostrando diferenças nas distâncias de dispersão de pólen em populações naturais de espécies zoófilas, incluindo espécies com vetores de polinização variados como borboletas, beija-flores e abelhas.

WEBB & BAWA (1983) realizaram um estudo comparando a dispersão de pólen em duas espécies de plantas tropicais, *Malvaviscus arboreus*, polinizada por beija-flores, e *Cnidoscolus urens* polinizada por borboletas. As avaliações do fluxo de pólen foram realizadas utilizando pó fluorescente como marcador e os resultados obtidos demonstram que a frequência de pólen transferido diminui acentuadamente com o aumento da distância da planta marcada. A maior parte do pólen transportado, em *M. arboreus*, encontra-se entre 0 e 100 metros da árvore marcada; entretanto, foram observados eventos de dispersão até 225,5 metros de distância. Em *C. urens*, a distância

média de dispersão foi de 8 metros, sendo a distância máxima observada de 31,2 metros.

CAMPBELL & WASER (1989) avaliaram a variação no fluxo de pólen intra e interpopulacional também em *Ipomopsis aggregata*, comparando sua relação com a variação dos caracteres florais nesta espécie. Os autores utilizaram pó fluorescente como marcador e verificaram grandes variações no fluxo de pólen nas diferentes populações, relacionando estas variações, em parte, com a densidade das plantas, que era diferente entre as populações e, em parte, com as variações dos caracteres florais, especialmente o comprimento dos estames, que era variável entre plantas. A distância média de dispersão de pó fluorescente verificada foi de até 6 metros da planta marcada, apresentando uma maior frequência entre zero e um metro.

THOMSON & THOMSON (1989) avaliaram a dispersão de pólen por uma espécie do gênero *Bombus*, em *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae), utilizando o polimorfismo para a cor do pólen como marcador e verificando a contribuição de cada visita do polinizador. Os autores registraram distâncias de dispersão de pólen de até 40 metros da planta marcada, com um pico entre 1,5 e 2,0 metros.

Em um estudo com populações experimentais, FENSTER (1991a) avaliou os dois componentes do fluxo gênico

(pólen e sementes) em *Chamaecrista fasciculata*. A dispersão de pólen foi estimada medindo-se o voo do polinizador e comparada com a dispersão de marcadores isoenzimáticos em um transecto experimental. A maioria dos voos do polinizador e dos eventos de dispersão de genes na área experimental foram menores do que 1 metro.

EGUIARTE et alii (1993) mediram o movimento de pólen em *Astrocaryum mexicanum*, uma palmeira tropical polinizada por coleópteros, e verificaram uma distância média de dispersão de pólen de aproximadamente 20 metros.

BROYLES & WYATT (1991) compararam o fluxo de pólen potencial através de observações do movimento dos polinizadores, que são borboletas, com o fluxo de pólen efetivo, através do método de análise de exclusão de paternidade e observaram que a dispersão de pólen efetiva, de cerca de 4,33 metros, determinada pela análise de exclusão de paternidade, foi aproximadamente três vezes maior do que a média da dispersão de pólen, de 1,3 metros, obtida através da observação do polinizador. Estes resultados mostram que o simples acompanhamento do voo do polinizador pode subestimar o fluxo de pólen real.

Outros trabalhos têm avaliado a influência da variação na densidade de plantas floridas sobre as distâncias de dispersão de pólen. Um destes estudos foi realizado por LINHART & FEINSINGER (1980) em populações

naturais de *Mandevilla hirsuta* e *Justicia secunda*, ambas polinizadas por beija-flores. O movimento de pólen foi acompanhado utilizando pó fluorescente e, em *J. secunda*, a dispersão de pólen foi estudada em densidades de floração variáveis, em dois locais diferentes. Os autores verificaram que as flores de *J. secunda*, no local em que a densidade era alta, foram visitadas mais frequentemente pelos polinizadores do que as flores em baixa densidade. Entretanto, houve uma maior distância de dispersão de pólen nos locais onde a densidade era baixa, alcançando até 140 metros de distância da planta marcada, enquanto que em alta densidade, a dispersão ocorria até aproximadamente 10 metros de distância.

Um outro estudo, com este enfoque, é apresentado por MURAWSKI (1987), que avaliou o fluxo de pólen, utilizando pó fluorescente como marcador, em *Psiguria warscewiczii*, uma espécie tropical polinizada por borboletas. Quando a densidade de flores era baixa, havia uma maior proporção de flores marcadas em distâncias intermediárias da planta fonte (100 a 250 metros). A densidade local de flores (medida em um raio de 50 metros a partir da planta marcada) representou aproximadamente 50% da variação observada na distância média de dispersão. Além disso, quando havia poucos recursos disponíveis (flores), muitas borboletas defendiam flores individuais

durante toda a manhã, não deixando que outras borboletas as visitassem e, quando havia grande quantidade de recursos, as visitas das borboletas eram rápidas e observava-se um maior movimento entre plantas. O autor observou, ainda, distâncias de dispersão de pólen de mais de 600 metros da árvore marcada.

GODT & HAMRICK (1993) avaliaram os padrões de movimento de pólen e fluxo gênico em *Lathyrus latifolius*, uma leguminosa perene, polinizada por uma espécie do gênero *Bombus*. A distância média do fluxo de pólen determinada variou de 11,6 a 13,3 metros entre locais e anos. Os autores observaram também que aumentos significativos nas taxas de fluxo gênico estavam associados com a diminuição na densidade de plantas floridas.

Além das variações na densidade de plantas, há outras características que podem influenciar as distâncias de dispersão de pólen e, conseqüentemente, as taxas de fluxo gênico em plantas, como por exemplo os padrões fenológicos, o comportamento dos vetores de polinização e os sistemas de cruzamento das espécies.

KAGEYAMA (1987) ressalta ainda que a distância de voo do polinizador tem importantes conseqüências genéticas para as populações, pois existem grandes diferenças entre os animais polinizadores quanto ao hábito na visita das flores, o que tem relação direta com a

distância efetiva que o pólen alcançaria na floresta.

2.3.4. Metodologias para avaliar o fluxo de pólen

Entre as metodologias disponíveis para avaliar as distâncias e curvas de dispersão de pólen, uma das mais utilizadas é a marcação de pólen com corantes, especialmente com pó fluorescente (LINHART & FEISINGER, 1980; WEBB & BAWA, 1983; MURAWSKI, 1987; CAMPBELL & WASER, 1989; EGUIARTE et alii, 1993).

Esta metodologia apresenta uma importante vantagem sobre o acompanhamento do movimento do polinizador, pois ela permite avaliar não só a distância a que o pólen está sendo transportado, mas também permite obter curvas de distribuição do transporte de pólen em várias distâncias dentro da população.

A utilização de pó fluorescente como marcador foi analisada com detalhes por WASER & PRICE (1982), em condições experimentais, comparando o transporte de pólen com o de pó fluorescente em *Ipomopsis aggregata*, uma espécie polinizada por beija-flor. Os autores verificaram que a dispersão tanto do pó fluorescente como de pólen apresentam os mesmos padrões, diminuindo na mesma proporção durante a sequência de visitaço. Os experimentos indicam que o pó fluorescente é um bom marcador para

estudos de transferência de pólen.

EGUIARTE et alii (1993) utilizaram três métodos diferentes para estimar o fluxo de pólen em *Astrocaryum mexicanum*: (1) marcação com pó fluorescente, (2) distância mínima entre inflorescências masculinas e femininas ativas e (3) alelos raros como marcadores genéticos. Todas as três estimativas de dispersão de pólen apresentaram resultados similares, o que reforça os resultados obtidos por WASER & PRICE (1982), mostrando que além do pó fluorescente ser um marcador com transporte análogo ao do pólen, ele também fornece resultados similares aos obtidos por outras metodologias.

2.4. Aspectos gerais do sistema reprodutivo de espécies arbóreas

O sistema reprodutivo de espécies vegetais tem sido estudado através da obtenção de estimativas da taxa de cruzamento, principalmente a partir de marcadores isoenzimáticos. As estimativas têm sido obtidas a partir de valores de coeficientes de endogamia ($\hat{f}$), e sua relação com a taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$) (WEIR, 1990a; VENCOSKY, 1992), ou através de estimativas de máxima verossimilhança (RITLAND & JAIN, 1981; RITLAND & EL-KASSABY, 1985).

De acordo com BROWN et alii (1989), a

utilização de marcadores isoenzimáticos, para obtenção das estimativas mencionadas, tem contribuído grandemente para o conhecimento da diversidade de sistemas de cruzamento. O autor mencionado refere que as variantes alozímicas possuem 3 vantagens distintas sobre os marcadores morfológicos para estudos do sistema reprodutivo de plantas: i. as alozimas são expressas codominantemente; ii. muitos locos isoenzimáticos são altamente polimórficos na maioria das populações e, iii. é pouco provável que as aloenzimas estejam sujeitas à fortes pressões seletivas.

Trabalhos mais recentes têm empregado, frequentemente, estimativas multiloco, especialmente para estudos em populações naturais de espécies arbóreas tropicais, como apresentado na Tabela 1.

Como pode ser verificado, a maioria das espécies estudadas apresentam taxas bastante altas, tendendo à alogamia. De acordo com MURAWSKI & HAMRICK (1991), somente duas espécies que ocorrem em baixa densidade, *Cavanillesia platanifolia* e *Ceiba pentandra*, exibem claramente sistemas de cruzamento misto (Tabela 1).

MURAWSKI & HAMRICK (1992a) demonstraram a importância da densidade de floração sobre a taxa de cruzamento em *Cavanillesia platanifolia*, verificando taxas de cruzamentos mais baixas quando havia menor densidade de plantas floridas. Os autores observaram que algumas árvores

TABELA 1. Estimativas multiloco das taxas de cruzamento ($\hat{t}_m$) em populações naturais de algumas espécies arbóreas tropicais. Piracicaba, SP, 1994

Espécie	$\hat{t}_m$ (erro padrão)	Nº de locos	Referência
<i>Bertholletia excelsa</i>	0.849(0.033)	02	O'Malley et alii, 1988
<i>Pithecellobium pedicellare</i>	0.951(0.022)	04	O'Malley & Bawa, 1987
<i>Cavanillesia platanifolia</i>	0.661(0.074)	06	Murawski & Hamrick, 1992a
<i>Beilschmedia pendulata</i>	0.918(0.058)	03	Murawski et alii, 1990
<i>Brosimum alicastrum</i>	0.875(0.035)	07	Murawski et alii, 1990
<i>Ceiba pentandra</i>	0.689(0.032)	06	Murawski & Hamrick, 1992b
<i>Platypodium elegans</i>	0.898(0.043)	10	Murawski & Hamrick, 1991
<i>Quararibea asterolepis</i>	1.008(0.010)	05	Murawski et alii, 1990
<i>Sorocea affinis</i>	0.969(0.020)	05	Murawski & Hamrick, 1991
<i>Trichilia tuberculata</i>	1.007(0.028)	03	Murawski & Hamrick, 1991

geraram progênies inteiras resultantes de autofecundação, sendo que estas árvores estavam muito mais isoladas que as outras.

Por outro lado, O'MALLEY & BAWA (1987) observaram altas taxas de cruzamento ($0,951 \pm 0,021$) em *Pithecellobium pedicellare*, apesar de esta também ser uma espécie que ocorre em baixa densidade, sugerindo que a espécie tem mecanismos de polinização eficientes para promover a fecundação cruzada à longas distâncias. Entretanto, os autores observaram heterogeneidade nas frequências alélicas do pólen e sugerem que esta população encontra-se subestruturada.

Em *Bertholletia excelsa*, uma árvore de dossel da Amazônia, O'MALLEY et alii (1988) observaram que a espécie é predominantemente de fecundação cruzada, mas baixos níveis de endogamia podem ocorrer ($\hat{t}_m = 0,85 \pm 0,03$).

AIDE (1986) demonstra que a distribuição das taxas de cruzamentos em plantas é fortemente influenciada pelo sistema de polinização. O autor ressalta que muitas das espécies polinizadas por animais mostram alta variação interpopulacional, quando comparadas às espécies anemófilas, sugerindo que a grande imprevisibilidade dos animais como vetores de pólen é um dos fatores que leva à estas grandes variações. Isto pode ser evidenciado através

de alguns estudos que mostram variações nas taxas de cruzamento em espécies polinizadas por animais, quando se tem diferentes densidades de plantas floridas (MURAWSKI & HAMRICK, 1991; MURAWSKI et alii, 1990).

Alterações na densidade de floração podem levar a diferentes padrões de variação nas taxas de cruzamento. Em *Platypodium elegans* e *Sorocea affinis*, MURAWSKI & HAMRICK (1991) observaram taxas de cruzamento mais altas, quando havia uma redução na densidade de plantas floridas.

No entanto, em *Cavanillesia platanifolia* observou-se um padrão inverso, relatado por MURAWSKI et alii (1990), demonstrando que quanto menor a densidade, menor a taxa de cruzamento. Estes dados sugerem que diferentes espécies de polinizadores e de plantas apresentam comportamentos distintos em relação a um mesmo fenômeno, resultando em diferentes consequências genéticas para as populações de plantas.

KAGEYAMA (1987) refere que muitas espécies tropicais apresentam assincronia de floração, o que resulta em implicações sobre o tamanho efetivo das populações, pois este comportamento das plantas pode levar a cruzamentos preferenciais, resultando em uma restrição do fluxo de pólen de forma contínua na floresta.

Um estudo que demonstra esta questão da assincronia foi realizado por MURAWSKI & HAMRICK (1992b) com *Ceiba pentandra*. Os autores observaram que a espécie tem um sistema de cruzamento misto, com uma estimativa de $\hat{t}_m$ de 0,689, conforme apresentado na Tabela 1, e verificaram que a taxa de cruzamento entre os indivíduos amostrados não foi aleatória, possivelmente devido à assincronia no tempo de floração, a cruzamentos preferenciais e a um comportamento de visita não aleatório dos morcegos polinizadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e População de estudo

O trabalho foi realizado em uma população natural de *Bauhinia forficata* localizada em um remanescente de floresta mesófila semi-decídua, na Estação Ecológica de Ibicatu. A área está sob administração do Instituto Florestal, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, e foi denominada de Reserva Estadual de Ibicatu, criada através do Decreto Nº 33.261 de 29 de julho de 1958. Atualmente é designada de Estação Ecológica de Ibicatu, criada pelo Decreto Nº 26.890 de 12 de março de 1987. A estação possui uma área de 76,4 ha., com altitude média de 500 metros entre as coordenadas 22°46'a 22°47' latitude sul e 47°43'a 47°45' longitude oeste e localiza-se no município de Piracicaba, Estado de São Paulo.

A estação representa um remanescente de floresta mesófila e encontra-se, atualmente, cercada por plantações de cana-de-açúcar e pastagens.

A amostra de população estudada encontra-se distribuída na margem do fragmento, ocupando uma área de

2.500 m², sendo constituída de aproximadamente 30 indivíduos em estágio reprodutivo, variando de 1,5 a 8,0 metros de altura.

Foram coletadas amostras foliares e sementes de 13 indivíduos da população, que apresentavam número de frutos suficiente para estimar a taxa de cruzamento, através de marcadores isoenzimáticos. Durante a fenofase de floração, no período de novembro de 1992 a fevereiro de 1993, foram realizadas observações e testes para o estudo da ecologia da polinização, bem como marcações com pó fluorescente para avaliação do fluxo de pólen, sendo utilizados nestas etapas todos os indivíduos que apresentavam flores.

3.2. Avaliação da Ecologia da Polinização

O estudo da biologia floral de *Bauhinia forficata* foi realizado no período de floração da espécie, de novembro de 1992 a fevereiro de 1993.

Durante o estudo, foram realizadas observações sobre a biologia e a morfologia da flor, em vários estádios do seu desenvolvimento. Dados sobre o horário e sequência da antese, receptividade do estigma, disponibilidade e viabilidade do pólen, duração da flor, volume e concentração do néctar foram registrados. Características das flores como odor,

coloração, tipo de alimento oferecido e sua localização foram também anotadas.

A receptividade do estigma foi testada com água oxigenada (ZEISLER, 1938) e com Sudam III glicerinado (JOHANSEN, 1940), em flores coletadas durante a noite (flores recém abertas) e no dia seguinte à sua abertura (flores em início de senescência), para avaliar a extensão do período de receptividade.

A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada utilizando-se o corante carmin acético, conforme descrito por RADFORD et alii (1974), que cora de vermelho os grãos de pólen viáveis, sendo as contagens efetuadas em lâminas de vidro analisadas em microscópio óptico.

As medidas de viabilidade do pólen, volume e concentração do néctar foram obtidas de amostras de 20 flores e os respectivos desvios padrões foram calculados. A concentração de açúcares no néctar foi medida com auxílio de um refratômetro de bolso e, para tal, foram isoladas flores em estágio pré-antese de vários indivíduos, no dia anterior à sua abertura, sendo as medidas realizadas após a antese. O volume de néctar acumulado por flor foi medido, utilizando-se capilares de 10 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro.

A presença de osmóforos foi verificada

utilizando-se vermelho neutro (VOGEL, 1963), sendo as flores mergulhadas na solução por aproximadamente quinze minutos e, em seguida, lavadas em água destilada para verificar se alguma região da flor permanecia corada, indicando assim a localização dos osmóforos.

As observações sobre os visitantes florais de *Bauhinia forficata* foram realizadas em todos os períodos do dia, perfazendo um total de 50 horas, distribuídas nos meses de janeiro e fevereiro de 1993. O estudo sobre o comportamento dos visitantes foi realizado a partir de observações visuais diretas no período diurno e com auxílio de lanternas elétricas, cobertas com filtros vermelhos, durante o período noturno.

Foram observados o horário, a duração, o comportamento de visita, o número de flores visitadas e o tipo de recurso coletado pelos visitantes.

Para a coleta dos visitantes, foram utilizadas três estratégias diferentes : (i) para coleta de exemplares de Hymenoptera e Lepidoptera, que visitavam as flores no período diurno, foi utilizada rede entomológica manual; (ii) para a coleta dos esfingídeos foram utilizadas armadilhas apropriadas conforme descrito por De VRIES (1987), que eram presas em ramos floridos de várias árvores e examinadas de hora em hora e, (iii) para coleta dos morcegos foram utilizadas duas redes de neblina "mist

nest", de 12 metros de comprimento por 3 metros de altura cada uma, armadas em quatro noites durante o período de observação de visitantes, na altura da copa das árvores.

Os visitantes capturados foram examinados em estereomicroscópio, para verificar a presença e o local de deposição do pólen; e em microscópio de fluorescência, para verificar a presença de partículas de pó fluorescente em estruturas do corpo das espécies coletadas. Após essas análises, os exemplares foram fixados para identificação, sendo que os insetos foram fixados a seco e os morcegos em formol 70%. Os exemplares de Lepidoptera (diurnos) e Chiroptera foram enviados à especialistas do Departamento de Zoologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, para identificação. Os exemplares de Lepidoptera (noturnos) e Hymenoptera foram enviados à especialistas do Departamento de Entomologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.

3.3. Medidas do fluxo de pólen

A análise do fluxo de pólen em *Bauhinia forficata* foi realizada em plantas floridas, localizadas na borda (margem) do remanescente de vegetação e distribuídas ao longo de uma área de aproximadamente 250

metros de comprimento por 10 metros de largura.

As marcações para medir o fluxo de pólen foram realizadas no período de dezembro de 1992 a fevereiro de 1993 e basearam-se na metodologia descrita por WASER & PRICE (1982), utilizando-se pó fluorescente como marcador, obtido da Hércules (Richmond, Califórnia).

Para determinar a distância e a quantidade de pólen transportada entre as plantas de *Bauhinia forficata*, foram realizadas marcações logo após a abertura das flores (entre 20:00 e 23:00 horas) em uma ou mais árvores próximas, procurando-se marcar um mínimo de cinquenta flores por noite. As marcações foram feitas depositando-se o pó fluorescente sobre as anteras deiscentes com o auxílio de um pincel fino, sendo que as árvores marcadas eram consideradas como "ponto zero", à partir do qual eram realizadas as coletas em seis classes de distância.

As coletas das flores foram realizadas no dia seguinte à marcação, no período da manhã. As distâncias e o número de flores previstas para coleta, a cada avaliação são apresentadas na Tabela 2. O critério utilizado foi o de se aumentar o número de árvores e de flores coletadas, à medida que aumentava a distância da árvore marcada, visando a obtenção de uma amostragem satisfatória nas várias classes de distância.

TABELA 2. Protocolo geral das distâncias e número de flores por coleta para o rastreamento de pólen marcado em *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

Distância(m) da árvore marcada	Número de árvores por coleta	Número de flores por árvore	Número total de flores
0-10	2	10	20
10-20	2	10	20
20-40	2	10	20
40-80	3	10	30
80-120	3	10	30
120-220	5	10	50

As flores coletadas tiveram seus estigmas retirados, dispostos em lâminas de vidro e analisados em microscópio de fluorescência do Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo. Esta análise permitiu verificar a presença e quantidade de grãos de pólen, marcados com pó fluorescente, sobre os estigmas das flores coletadas nas várias classes de distância. Os grãos marcados emitem brilho intenso sob a luz ultravioleta do microscópio, permitindo facilmente sua identificação e contagem.

Após as contagens, foram determinadas a porcentagem de estigmas e flores que receberam pólen do indivíduo marcado, assim como avaliado o número médio de grãos de pólen marcados por estigma nas diversas classes de distância, fornecendo assim informações sobre o raio de ação do polinizador.

3.4. Análises eletroforéticas

a. Tecidos das plantas para eletroforese de isoenzimas

As análises de eletroforese de isoenzimas foram realizadas utilizando-se tecidos foliares de plântulas e de indivíduos adultos. Para as análises das progênies, foram coletadas folhas intactas de plantas com nove meses a partir da semeadura, cultivadas em viveiro com 50% de sombrite, sendo que os tecidos eram imediatamente submetidos à extração e aos procedimentos de eletroforese, para evitar alterações ou degradação das enzimas nos mesmos.

As folhas das plantas adultas (genitoras), coletadas na área experimental, foram imediatamente trazidas para o laboratório e, após terem sido

realizadas as extrações, as amostras foram devidamente acondicionadas para as análises posteriores.

b. Escolha dos sistemas isoenzimáticos

Foram realizadas análises preliminares para os 12 sistemas isoenzimáticos listados a seguir acompanhados de seus respectivos códigos (E.C.) da "Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (1976)":

Alfa-Esterase (Alfa-EST- E.C.3.1.1.1),
Beta-Esterase (Beta-EST-E.C.3.1.1.1),
Glutamato Desidrogenase (GDH-E.C.1.1.1.49),
Leucina Aminopeptidase (LAP-E.C.3.4.11.1),
Shiquimato Desidrogenase (SKDH-E.C.1.1.1.25),
Malato Desidrogenase (MDH-E.C.-1.1.1.37),
Isocitrato Desidrogenase (IDH-E.C.1.1.1.42),
Fosfatase Ácida (ACP-3.1.3.2),
Álcool desidrogenase (ADH-E.C.1.1.1.1),
Peroxidase (PER-E.C.1.11.1.7),
Fosfoglicose Isomerase (PGI-E.C.5.3.1.9) e
6-Fosfogliconato Desidrogenase (6PGD-E.C.1.1.1.44).

Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares, foram escolhidos os sistemas enzimáticos IDH

e Alfa-EST, que apresentaram boa resolução para os tecidos de limbos foliares de plantas adultas (genitoras) e de plantas de 9 meses de idade (progênies).

c. Extração de isoenzimas

Para a extração de isoenzimas foram utilizadas amostras de aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, maceradas com aproximadamente 07 mg de PVPP (Polivinil Polipirrolidona), 10 mg de areia lavada (areia peneirada, lavada com ácido sulfúrico e livre de limalhas de ferro) e 100 microlitros de solução de extração nº 01 de ALFENAS et alii (1991).

Os tecidos foram macerados, com o auxílio de um bastão de vidro, sobre placas de porcelana previamente resfriadas, mantidas durante a extração sobre barras de gelo para evitar a desnaturação das isoenzimas.

Os extratos de cada amostra eram absorvidos em pedaços de papel filtro (papel whatman nº3), com dimensões de 6mm x 10mm, que eram colocados lado a lado no gel. Em cada gel eram colocadas 20 amostras e mais 2 pedaços de papel filtro contendo solução azul de bromofenol a 0,1%, em cada uma das extremidades, para marcar a linha de frente durante a migração.

d. Procedimentos de eletroforese

O meio suporte utilizado para a eletroforese foi o gel de penetrose de milho, com concentração de 13%. O sistema tampão gel / eletrodo utilizado para os 2 sistemas enzimáticos (IDH e Alfa-EST) foi o Tris-Citrato (TC), conforme descrito por SOLTIS et alii (1983). Para preparar o tampão para o eletrodo utilizou-se: Trizma base (0,223M) e ácido cítrico (0,086M), sendo o pH ajustado em 7,5. O tampão do gel foi preparado através da diluição a 3,5% do tampão do eletrodo. A técnica de eletroforese utilizada foi a de migração das isoenzimas em géis horizontais, mantidos durante toda a corrida em refrigerador à 4°C.

Para a corrida eletroforética, utilizou-se 20 mA de corrente constante e voltagem de 130 V durante 30 minutos, após os quais a corrente era aumentada para 45 mA e a voltagem para 250 V. Após 45 minutos do início da corrida as amostras de papéis de filtro eram retiradas. O tempo de corrida era de aproximadamente 6 horas, quando o marcador de bromofenol atingia em torno de 8,0 a 9,0 cm de migração.

Completada a migração, os géis eram cortados em quatro fatias de 2,5 mm de espessura cada uma e preparados para a coloração. A primeira e a última fatias eram desprezadas, a segunda era utilizada para a coloração

da Isocitrato desidrogenase (IDH) e a terceira para a coloração da Alfa-Esterase (Alfa-EST).

Para a revelação das isoenzimas, foram utilizados os seguintes protocolos:

a) Alfa-EST (Alfa-esterase)- Modificado a partir de SOLTIS et al.(1983)

Solução "A"

- Alfa-Naftil Acetato (40 mg/ml de acetona 50%)	01ml
- Tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 6,0	40ml

Solução "B"

- Fast Garnet GBC (salt) (30 mg/ml de n-propanol)	02ml
- Tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 6,0	10ml

Procedimento: O gel era imerso na solução "A" por 20 minutos e em seguida era adicionada a solução "B"; tempo de revelação 50 minutos; temperatura: 37°C.

b) IDH (Isocitrato desidrogenase)- Modificado a partir de STUBER et al. (1988)

- DL-Ácido Isocítrico, Na3	100mg
- MTT	10mg
- NADP+	10mg
- PMS	01mg
- MgCl ₂	10mg
- Tampão Tris-Hcl 0,1M, pH 8,0	50ml

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 40 minutos; temperatura: 37°C.

e. Leitura dos zimogramas

A leitura dos zimogramas ocorria logo após a revelação das isoenzimas, quando as bandas eram desenhadas em filme plástico com canetas de retroprojektor, guardando suas dimensões originais. Também eram desenhadas as marcas de migração do marcador de bromofenol, para comparações relativas entre os géis e obtenção dos respectivos valores de Rf, conforme citado por FERRAZ et alii (1994). Sendo também empregado o parâmetro RM (migração relativa), conforme descrito por CHELIAK & PITTEL (1984), que considera como banda padrão o alelo mais frequente na população, que recebe o valor 100, sendo a migração relativa de todos os outros alelos, de cada loco, calculada em relação à banda padrão. Logo após desenhados, os géis eram fotografados, permitindo com isso a disponibilidade de reproduções fiéis dos zimogramas, para conferir eventuais dúvidas no momento da interpretação.

3.5. Análise dos dados isoenzimáticos

Para se avaliar o sistema reprodutivo de *Bauhinia forficata*, foram obtidas as frequências de cada um dos quinze alelos encontrados na população estudada e, a

partir delas, foram obtidas as frequências genotípicas esperadas para realizar o teste de Qui-quadrado para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para o teste do Qui-quadrado foi utilizado o programa Biosys-1 desenvolvido por SWOFFORD & SELANDER (1989), que agrupa as frequências esperadas dos alelos menos frequentes, ficando os genótipos de cada loco, reunidos em três classes: i. homozigotos para o alelo mais comum, ii. heterozigotos compostos pelo alelo mais comum e os outros alelos e iii. todos os outros genótipos. O valor do qui-quadrado resultante é usado com um grau de liberdade em cada loco.

A partir dos resultados obtidos com o teste do qui-quadrado para os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, procedeu-se às estimativas da taxa de cruzamento de *Bauhinia forficata*. Estas estimativas foram obtidas utilizando-se duas metodologias distintas. A primeira baseia-se na análise de variância das frequências gênicas, para cada um dos alelos presentes na população (WEIR, 1990a; VENCovsky, 1992), sendo válida apenas se a população estiver em equilíbrio de endogamia, e foi denominada taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$); e a segunda, se baseia na utilização de estimadores de máxima verossimilhança, conforme proposto por RITLAND & JAIN (1981), através do programa multiloco desenvolvido por RITLAND (1990), denominada taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$).

3.5.1. Estimativas da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$)

A análise de variância das frequências gênicas, para cada um dos alelos presentes na população em estudo, permite estimar a taxa aparente de fertilização cruzada ($\hat{t}_a$), que pode ser obtida através da estimativa de $\hat{f}$ se a população em estudo estiver em Equilíbrio de Wright (equilíbrio com endocruzamento). Para tanto, VENCovsky (1992) sugere que é conveniente testar a validade da suposição do Equilíbrio de Wright, antes de se estimar a taxa de cruzamento com base no coeficiente de endogamia.

a) Qui-quadrado para os desvios de equilíbrio de endogamia

O coeficiente de endogamia ($\hat{f}$) para a população foi estimado a partir das frequências genotípicas esperadas (H_e) e observadas (H_o) de heterozigotos, conforme demonstrado inicialmente por WRIGHT (1922) e por WEIR (1990a), através da seguinte expressão:

$$\hat{f} = (\hat{H}_e - \tilde{H}_o) / \hat{H}_e$$

onde:

$\hat{H}_e = 1 - \sum P_u^2$, sendo P_u^2 a frequência esperada de homozigotos para o alelo u,

$\tilde{H}_o = 1 - \sum P_{uu}$, sendo P_{uu} a frequência observada de homozigotos para o alelo u.

O valor de $\hat{f}$ obtido através desta expressão foi utilizado para se estimar as frequências genotípicas esperadas, usadas para se testar os desvios do equilíbrio de Endogamia de Wright, através do teste de Qui-quadrado. Os genótipos com frequências próximas de um foram agrupados em classes, sendo possível utilizar apenas os locos que apresentavam número de alelos suficiente para permitir este agrupamento.

b) Análise de variância

A estimativa da taxa aparente de fertilização cruzada ($\hat{t}_a$) foi obtida através da análise de variância para cada alelo identificado na população, conforme proposto por WEIR (1990a) e por VENCOVSKY (1992).

Este procedimento foi utilizado para estimar os seguintes parâmetros genéticos: variância entre famílias (σ_F^2), variância entre indivíduos/famílias (σ_I^2), variância entre genes/indivíduos/famílias (σ_G^2), variância total (σ_T^2), grau de parentesco dentro de famílias ($\hat{\theta}_1$), coeficiente de endogamia dentro da população ($\hat{f}$) e taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$).

As análises foram feitas em esquema hierárquico desbalanceado e o modelo matemático utilizado, com dois níveis de hierarquia, foi:

$$Y_{ijk} = m + f_i + h_{j(1)} + g_{k(1j)}$$

onde : Y_{ijk} é a frequência do gene k , dentro do indivíduo j , da família i ;
 m é a média geral;
 f_i é o efeito da família i , com $i = 1, 2, \dots, l$;
 $h_{j(i)}$ é o efeito do indivíduo j , dentro da família i , com $j = 1, 2, \dots, m_i$;
 $g_{k(ij)}$ é o efeito do gene k , dentro do indivíduo j , na família i com $k = 1, 2, \dots, n_{ij}$.

O esquema da análise de variância é demonstrado na Tabela 3.

TABELA 3. Análise de variância para um alelo de um dado loco em um modelo hierárquico desbalanceado, contendo como fontes de variação famílias (F), indivíduos (I/F) e genes (G/I/F), conforme VENCOSKY (1992). Piracicaba, SP, 1994

F. V.	GL	SQ	QM	ECQM
Famílias	$l - 1$	SQ_F	QM_F	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + K\sigma_F^2$
Indivíduos	$\sum_{i=1}^l m_i - 1$	SQ_I	QM_I	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2$
Genes	$\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{m_i} n_{ij} - \sum_{i=1}^l m_i$	SQ_G	QM_G	σ_G^2

A análise de variância foi realizada, considerando 1 famílias na população, m indivíduos por progênie e n=2 genes por loco em cada planta, sendo que o índice K foi obtido através da média harmônica do número de indivíduos das progênies vezes o número de genes por loco, utilizando o programa PROC NESTED (SAS Institute, 1985), conforme recomendado por WEIR (1990b).

c) Componentes de variância

As estimativas dos componentes da variância foram obtidas conforme a metodologia apresentada por WEIR (1990a), a partir dos seguintes desdobramentos:

$$\begin{aligned}\hat{\sigma}_G^2 &= QM_G, \\ \hat{\sigma}_I^2 &= (QM_I - QM_G) / 2, \\ \hat{\sigma}_F^2 &= (QM_F - QM_I) / K, \\ \hat{\sigma}_T^2 &= \sigma_G^2 + \sigma_I^2 + \sigma_F^2.\end{aligned}$$

Os coeficientes de co-ancestralidade ($\hat{\theta}_1$), de endogamia dentro da população ($\hat{f}$) e taxa aparente de cruzamento ($\hat{t}$), para cada alelo, foram obtidos através de:

$$\begin{aligned}\hat{\theta}_1 &= \sigma_F^2 / \sigma_T^2, \\ \hat{f} &= 1 - (\sigma_G^2 / \sigma_T^2), \\ \hat{t} &= (1 - \hat{f}) / (1 + \hat{f}).\end{aligned}$$

Sendo que:

$$\hat{\sigma}_G^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) (1 - \hat{f}),$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) (\hat{f} - \hat{e}_1),$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) \hat{e}_1,$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}).$$

Considerando a existência de a alelos na população e que para cada um deles é realizada uma análise de variância, teremos Σa análises. Pressupondo que os alelos são seletivamente neutros, procede-se uma análise conjunta reunindo todos os alelos, obtendo-se uma média dos quadrados médios por alelo e reunindo-se os locos obtendo-se uma média dos quadrados médios por loco, como segue :

$$QM_F = (\Sigma SQ_F) / (\Sigma GL_F),$$

$$QM_I = (\Sigma SQ_I) / (\Sigma GL_I),$$

$$QM_G = (\Sigma SQ_G) / (\Sigma GL_G).$$

d) Obtenção de $\hat{t}_a$

Considerando a existência de Equilíbrio de Endogamia na população de *Bauhinia forficata* estudada, a taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$) pode ser estimada, segundo WEIR (1990a) e VENCovsky (1992), através de:

$$\hat{t}_a = (1 - \hat{f}) / (1 + \hat{f})$$

3.5.2. Estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$)

O modelo de cruzamento misto, proposto por RITLAND & JAIN (1981), foi utilizado para estimar a taxa de cruzamento multiloco da população ($\hat{t}_m$); as taxas de cruzamento dos locos individuais ($\hat{t}_s$) e as frequências alélicas do pólen e do óvulo.

Para obtenção destas estimativas foi utilizado o programa multiloco de cruzamento misto desenvolvido por RITLAND (1990). Este programa testa, também, se as frequências genotípicas da progênie apresentam desvios significativos do esperado no modelo, através de um teste de qui-quadrado de adequação ao modelo, que é usado com um grau de liberdade para um loco dialélico e com nove graus de liberdade para um loco trialélico.

O erro padrão da estimativa $\hat{t}_m$ foi calculado pelo método "bootstrap", sendo cada estimativa do erro padrão baseada em 100 "bootstraps".

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da ecologia da polinização

4.1.1. Análise da biologia floral

A morfologia da flor nos vários estádios de seu desenvolvimento é apresentada esquematicamente na Figura 1. O botão pré-antese é ilustrado na Figura 1a, sendo que a partir desta fase inicia-se a antese da flor. Na Figura 1b pode-se ver o início da abertura da flor, que ocorre entre as 18:30 e 21:00 hs., e inicia-se com uma fenda longitudinal no cálice, que leva cerca de uma hora para se completar, quando então ocorre a exposição das pétalas que começam a se abrir da base para o ápice. Entre 20:00 e 22:30 hs., trinta minutos após a abertura do cálice, todas as estruturas da flor apresentam-se livres e eretas, como ilustrado na Figura 1c.

Figura 1- Estádios da antese das flores de Bauhinia forficata. 1a.botão pré-antese; 1b.início da abertura; 1c.exposição completa das estruturas florais; 1d.antese completa; 1e. estágio de senescência (12 a 18 hrs. após a abertura).

Nesta fase, os lobos estigmáticos iniciam a abertura gradativamente e as anteras já se apresentam deiscentes, com pólen disponível, observando-se inclusive flores com os lobos estigmáticos repletos do próprio pólen. Aproximadamente quarenta minutos após a exposição da flor, todas as suas estruturas curvam-se para cima conforme demonstrado na Figura 1d e, neste momento, os lobos estigmáticos já se encontram completamente abertos.

Cerca de 12 a 15 horas após a antese, especialmente em dias ensolarados e com temperatura elevada as flores apresentam-se em estágio de senescência com as pétalas parcialmente murchas, os filetes com as extremidades ressecadas e escurecidas, geralmente sem anteras e o gineceu desidratado e pendente (Figura 1e), o que confere com as características das plantas quiropterófilas, que em sua maioria apresentam flores que duram apenas uma noite (FAEGRI & PILJ, 1979).

Os estigmas mostraram-se receptivos durante 12 a 15 horas após a antese, tanto nas análises realizadas com água oxigenada como com o corante Sudan III glicerinado. Após esse período os lobos apresentam-se dessecados e com coloração mais escura tendendo ao marrom e não estão mais receptivos.

O pólen já está disponível no momento em que

a flor inicia a antese, e os testes realizados com o corante Carmin acético, utilizando-se pólen coletado de flores recém abertas, mostraram uma média de $98,89 \pm 0,87\%$ de grãos de pólen viáveis. As análises realizadas, com pólen coletado 12 horas após a abertura das flores, apresentaram também alta porcentagem de grãos de pólen viáveis, com média de $85,26 \pm 9,07\%$.

Estes resultados indicam que as flores de *Bauhinia forficata* são funcionalmente hermafroditas, apresentando tanto as estruturas femininas quanto as masculinas ativas.

Entretanto, apesar dos grãos de pólen ainda apresentarem-se viáveis no dia seguinte à abertura das flores, neste período os estames já se encontram desprovidos de anteras ou, quando estas ainda estão presentes, já se encontram praticamente vazias.

Conforme ilustrado nas Figuras 1c e 1d, os estames, em número de 10, apresentam as anteras voltadas para cima, com o pólen totalmente exposto. Este tipo de exposição de pólen, característico em espécies do gênero *Bauhinia*, parece ser bastante eficiente para o transporte por morcegos, sendo ilustrado por GRIBEL et alii (1990). Os autores citados apresentam um registro fotográfico que mostra o morcego glossofagíneo *Anoura caudifer* visitando uma flor de unha-de-vaca (*Bauhinia* sp) com a região do

abdome repleta de grãos de pólen, tocando as anteras que apresentam uma disposição bastante semelhante a verificada em *B. forficata*.

Com relação à presença de néctar, foi verificado que o mesmo localiza-se na base da corola, ou cavidade do hipanto, sendo que o volume médio de néctar acumulado por flor foi de 520 ± 315 ul. Este volume é maior que o volume médio observado em *Bauhinia bongardii*, de 231,1 ul (BERGALLO, 1990), estando mais próximo do volume encontrado em *Bauhinia unguolata*, de 621 ul, apresentado por RAMIREZ et alii (1984).

A concentração média de açúcares no néctar foi de $16 \pm 0,9\%$, que está na amplitude de variação conhecida para diversas espécies quiropterófilas, sendo também equivalente às concentrações observadas em outras espécies do gênero *Bauhinia*. Em *Bauhinia ruffa*, SAZIMA & SAZIMA (1978) observaram concentrações de 15%, enquanto BERGALLO (1990) observou concentração média de 15,6% em *Bauhinia boungardii*.

Não foram verificadas regiões coradas nas flores de *Bauhinia forficata*, quando utilizou-se o corante vermelho neutro para detecção de osmóforos, e durante as observações não foi observada a presença de qualquer odor característico proveniente das flores.

4.1.2. Análise dos visitantes florais

Foram observadas 10 espécies de borboletas (Lepidoptera), duas de coleópteros (Coleoptera), uma de vespa (Hymenoptera) e uma de beija-flor (Apodiforme) visitando as flores de *Bauhinia forficata*, no período diurno. Na Tabela 4 estão sumarizados o período de visita, o número médio de flores visitadas no período e a duração das visitas dos principais grupos de visitantes das flores de *B. forficata*, no período diurno.

Nenhuma das espécies observadas, no período diurno, com exceção do beija-flor, apresentou comportamento de visita que as incluísse como polinizadoras. O beija-flor apresenta algumas características que sugerem a possibilidade desta espécie atuar como vetor de transferência do pólen. Entretanto, suas visitas foram esporádicas, com apenas duas visitas no período da manhã em um só dia, o que não permitiu observações detalhadas de seu comportamento. Além disso, a baixa frequência de visitas desta espécie sugere que ela não apresenta um papel efetivo na polinização de *Bauhinia forficata*.

Adicionalmente, conforme demonstrado na Figura 1e, as flores de *Bauhinia forficata* já se encontram em estágio de senescência no dia seguinte após a noite de abertura, reduzindo, portanto, a possibilidade de qualquer visitante diurno atuar como polinizador da espécie.

TABELA 4. Visitantes florais diurnos de *Bauhinia forficata*, períodos de visita, números médios de flores visitadas no período (N) e duração média das visitas. Piracicaba, SP, 1994

VISITANTES	PERÍODO DE VISITA	N	DURAÇÃO DA VISITA
Apodiforme			
Trochilidae	09:00-12:00	2	2 a 3 seg.
Coleoptera	09:00-11:00	3	3 a 15 min.
Hymenoptera			
Fam. Vespidae			
<i>Sinoeca</i> sp.	06:00-12:00	19	1 a 2 min.
Lepidoptera			
(8 espécies)	08:00-14:00	24	2 a 60 seg.
Fam. HesperIIDae			
<i>Nascus phocus</i>	19:00-19:30	2	2 seg.
Fam. Nymphalidae			
<i>Doxocopa kallina</i>	08:00-13:00	5	5 seg.

Além disso, várias características florais de *Bauhinia forficata*, tais como antese noturna, coloração branca, grande quantidade de pólen disponível e outras, indicam que a espécie apresenta atributos especializados à polinizadores noturnos (FAEGRI & PIJL, 1979).

Entre os visitantes noturnos de *Bauhinia forficata*, foram observadas seis espécies distintas de mariposas (Sphingidae e Noctuidae) e uma espécie de morcego (Phyllostomidae) (Tabela 5).

A espécie de Noctuidae chegava à flor em vôo lateral, pousava na base da corola, segurando-se por um ou dois pares de pernas a uma das pétalas ou aos filetes. Em seguida, introduzia a probóscide na região central da corola, permanecendo cerca de 2 segundos na flor. Após

TABELA 5. Visitantes noturnos em *Bauhinia forficata*, períodos de visita, números médios de flores visitadas por período (N) e durações das visitas. Piracicaba. SP, 1994

VISITANTES	PERÍODO DE VISITA	N	DURAÇÃO DA VISITA
Lepidoptera			
Fam. Sphingidae	21:00-01:00	21	1 a 6 seg.
<i>Pholus satellitia</i>			
<i>Pholus fasciatus</i>			
<i>Pholus eacus</i>			
<i>Triptogon ocypete</i>			
Fam. Noctuidae			
(1 espécie)	21:00-03:00	8	2 a 3 seg.
Chiroptera			
Fam. Phyllostomidae	23:00-03:00	9	fração de
<i>Carollia perspicillata</i>			segundo

isto, deixava a flor, voando por cima das anteras e do estigma, sem tocá-los em nenhum momento da visita. O horário de maior frequência de visita ocorria por volta das 23:00 horas, embora tenham sido registradas visitas no período das 21:00 às 03:00 hs.

Os esfingídeos observados visitando as flores de *Bauhinia forficata* pertencem aos gêneros *Pholus* e *Triptogon*. As espécies do gênero *Pholus* (*P. satellitia*, *P. fasciatus*, *P. eacus*) e do gênero *Triptogon* (*T. ocypete*) visitavam intensamente as flores, permanecendo cerca de 1 a 6 segundos em cada flor, por tempo variável em cada árvore, algumas vezes visitando várias flores na mesma árvore, outras vezes visitando só uma flor e passando em seguida para uma árvore próxima. Durante as visitas permaneciam em vôo pairado defronte a flor, introduzindo repetidamente a probóscide na porção central da corola, descrevendo movimentos rápidos (fração de segundo) de entrada e saída da flor, durante os quais algumas regiões do corpo poderiam entrar em contato com as estruturas reprodutivas da flor.

Entretanto, nas análises em estereomicroscópio e no microscópio de fluorescência, não foram encontrados grãos de pólen, nem partículas de pó fluorescente, em nenhuma estrutura ou parte do corpo das

espécies de esfingídeos, inclusive daqueles exemplares coletados durante as visitas. Isto indica que estas espécies provavelmente não estão transportando pólen e, portanto, não foram incluídas como prováveis polinizadoras de *Bauhinia forficata*.

Com relação às visitas de Chiroptera, foi observada apenas uma espécie de Phyllostomidae visitando as flores de *Bauhinia forficata*. Os dois exemplares capturados com o auxílio da rede de neblina pertenciam a espécie *Carollia perspicillata*, sendo um macho e uma fêmea.

Esta espécie chegava à flor em vôo frontal, visitando cerca de duas a três flores na mesma árvore, pairando em frente à flor com a cabeça voltada para a região central da corola, permanecendo uma fração de segundo em cada flor e abandonando a árvore em seguida. O pico de visita ocorreu das 23:00 às 03:00 horas, como está demonstrado na Tabela 5.

É possível que o fato de várias flores apresentarem os filetes desprovidos de anteras, no dia seguinte à abertura das flores, seja consequência de danos mecânicos produzidos pelos morcegos, o que também foi verificado por RAMIREZ et alii (1984) em *Bauhinia ungulata*. As asas e raspados de pelos das regiões da cabeça, pescoço e abdome dos exemplares de morcegos coletados foram

analisados em estereomicroscópio e microscópio de fluorescência, revelando a presença de pólen nestas regiões, inclusive grãos de pólen marcados com pó fluorescente e também partículas de pó fluorescente isoladas, aderidas às asas. Estes resultados sugerem que *Carollia perspicillata* estava transportando pólen entre indivíduos de *Bauhinia forficata*, pois as características de comportamento de visita, dimensões do visitante, frequência de visita e presença de pólen, inclusive marcado com pó fluorescente no corpo do animal, qualificam a espécie como polinizadora.

Carollia perspicillata, considerada como uma espécie primariamente frugívora (PEDRO, 1992), também foi observada alimentando-se de néctar de algumas espécies de plantas. Um estudo que mostra este aspecto foi realizado por HEITHAUS et alii (1975), no qual foram avaliados os padrões de alimentação de sete espécies de morcegos em uma floresta tropical, entre elas, *Carollia perspicillata*. Os autores observaram que a nectarivoria é alta entre as espécies estudadas, inclusive entre aquelas consideradas primariamente frugívoras como, *Carollia perspicillata*, e ressaltam que a associação do comportamento reprodutivo das plantas com as características de alimentação dos morcegos antófilos promovem fecundação cruzada a longas distâncias, sendo este um importante fator para muitas espécies de

plantas tropicais que apresentam populações com baixa densidade.

SAZIMA (1976) observou a espécie *Carollia perspicillata* coletando néctar de flores de *Passiflora mucronata* e *Musa acuminata*, mencionando que, durante as visitas, esta espécie de morcego exibe uma extraordinária habilidade de voo, realizando vôos diretos e curtos ao redor das flores, e coletando o néctar durante um contato muito rápido com a flor. O autor conclui que *Carollia perspicillata* pode atuar como nectarívoro, sendo que a habilidade de voo e a ampla ocorrência desta espécie fazem dele um importante agente polinizador.

HEITHAUS & FLEMING (1978) estudaram a distância média de voo de *Carollia perspicillata* em uma área incluindo tanto floresta como pastagens. Através do acoplamento de transmissores de rádio nos animais, os autores mediram seus movimentos com precisão, registrando distâncias médias de voo de 1,6 Km entre as áreas de alimentação. Todos os morcegos utilizavam mais de uma "área de alimentação", que é definida pelos autores como locais onde os morcegos gastam ao menos 30 minutos se alimentando. Verificaram ainda que a distância média de voo foi de 4,7 Km por noite, e que os indivíduos desta espécie se alimentam solitariamente, não exibem comportamento de territorialidade e atravessam pastagens para se locomover

entre diferentes áreas de alimentação.

Este tipo de comportamento de *Carollia perspicillata* pode resultar em importantes consequências sobre a variação genética das populações de *Bauhinia forficata*, especialmente aquelas que ocorrem em forma de colônias e em áreas abertas, possibilitando cruzamento entre indivíduos distantes, inclusive entre os indivíduos que se encontram dentro da floresta e os localizados na borda.

4.2. Avaliação do fluxo de pólen

A avaliação do fluxo de pólen, na população estudada de *Bauhinia forficata*, teve como objetivo principal dimensionar a distância e o número de grãos de pólen transportados pelo polinizador da espécie. Para obter essas informações, foram realizadas marcações com pó fluorescente e avaliada a transferência de pólen entre plantas. Embora as coletas tenham sido realizadas seguindo o protocolo apresentado na Tabela 2, nem sempre foi possível coletar o número de flores pré-estabelecido, em função da variação na quantidade de flores disponíveis nos diferentes dias de coleta (repetições) e nas diferentes classes de distância.

Os dados sobre o número médio de pólen

marcado por estigma, com os respectivos desvios padrões e o número de estigmas coletados nas seis classes de distância e sete repetições encontram-se no Apêndice 1 .

Na Tabela 6 encontram-se os valores médios de grãos de pólen marcados, a porcentagem de estigmas marcados em cada uma das repetições e o número de flores coletadas, agrupando-se as classes de distância de cada repetição.

Entre as sete marcações, observa-se que em duas noites (repetições 2 e 6) houve uma maior quantidade de pólen transportado, sendo que a repetição 6 apresentou 89,83% de seus estigmas marcados com pó fluorescente, que é mais que o dobro do verificado nas repetições 1, 3 e 5. Na tabela 6 observa-se que o valor de N, que corresponde ao número de flores coletadas, é mais alto nas três primeiras repetições, quando havia uma maior densidade de floração.

MURAWSKI (1987) verificou que variações na densidade de floração explicaram quase 50% das variações observadas nas distâncias de dispersão de pólen em *Psiguria warscewiczii*. Entretanto, em *Bauhinia forficata*, não foi verificado um padrão definido associando a variação na densidade de flores com variações na dispersão de pólen, sendo que as repetições 2 e 6 apresentaram alta transferência de pólen, embora tivessem diferentes números de flores disponíveis na noite da marcação (N).

TABELA 6. Número médio de flores coletadas (N), número médio de grãos de pólen marcados por estigma (P) e porcentagem de estigmas marcados (E), avaliados em diferentes repetições em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

REP.	N	P	E (%)
1	142	1.15	40.56
2	140	3.31	72.14
3	110	0.91	43.64
4	28	2.14	53.57
5	70	2.19	44.29
6	59	6.03	89.83
7	64	2.08	65.62

Na Tabela 7 são apresentados dados sobre o número médio de pólen marcado e porcentagem de estigmas marcados nas diferentes classes de distância.

Com relação à transferência de pólen em função da distância da planta marcada, observa-se na Tabela 7 que as maiores porcentagens de estigmas marcados com pó fluorescente estão entre 0 e 20 metros de distância.

TABELA 7. Número médio de pólen marcado por estigma (P) e porcentagem de estigmas marcados (E), avaliados em seis classes de distância, em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

DISTANCIA (m)	P(s)*	E
0-10	4.00(5,76)	73.53
10-20	3.22(4,60)	71.87
20-40	2.68(6,72)	53.04
40-80	1.23(2,73)	43.31
80-120	0.86(1,26)	44.90
120-220	1.21(1,95)	43.48

* Os valores entre parenteses correspondem ao desvio padrão da média

Tanto os dados do número médio de pólen marcado por estigma (P), como os da porcentagens de estigmas marcados (E), mostram a mesma tendência, indicando uma alta transferência de pólen até 20 metros de distância da planta marcada. Os dados referentes a porcentagem de estigmas marcados mostram uma redução de 20% entre 20 e 40 metros e mantendo-se praticamente constante a partir dos 40 metros, apresentando mais de 40% dos estigmas marcados na distância máxima de coleta (220 metros). Isto sugere que a transferência de pólen ocorre através de longas distâncias, pois até 220 metros, não se observou diminuições acentuadas

nas porcentagens de estigmas marcados, nem na quantidade de pólen marcado (N).

Tal resultado difere do observado em outras espécies de plantas (WEBB & BAWA, 1983; LEVIN & KERSTER, 1974), em que as curvas de dispersão apresentam padrões leptocúrticos, com diminuições acentuadas à poucos metros da planta marcada. Esta característica da transferência de pólen alcançar longas distâncias está de acordo com o comportamento do polinizador, *Carollia perspicillata*, que voa vários quilômetros por noite, resultando, portanto, em um fluxo de pólen de longo alcance, na espécie *Bauhinia forficata*.

4.3. Avaliação do Sistema Reprodutivo

a. Interpretação genética dos zimogramas

Na Figura 2 são apresentados, esquematicamente, os padrões observados nos quatro locos, para os dois sistemas enzimáticos estudados. São também registrados os valores de migração relativa RM e Rf de cada alelo, ao lado direito da figura, e todos os genótipos encontrados em cada um dos locos analisados.

FIGURA 2. Esquema dos zimogramas apresentando os fenótipos dos locos Est-1, Est-2, Est-3, Idh-1, com seus respectivos valores de RM, Rf e genótipos.

O sistema isoenzimático ALFA-Esterase (EST) apresentou 3 locos nítidos, que foram utilizados neste estudo. Os heterozigotos presentes nos três locos deste sistema enzimático indicaram que as enzimas têm suas estruturas moleculares compostas por uma subunidade de cadeia polipeptídica, ou seja, são monoméricas.

De acordo com KEPHART (1990), o sistema enzimático EST pode apresentar de dois a dez locos e as enzimas possuem estrutura monomérica ou dimérica. Para *Bauhinia forficata*, foram utilizados para interpretação somente três locos, mas eram visíveis nos zimogramas aparentemente mais dois locos, sendo um de migração intermediária entre os locos Est-2 e Est-3 e o outro mais rápido que o loco Est-1. Entretanto, eles não foram utilizados pois não apresentaram boa resolução.

Para o loco Est-3, que apresentou migração mais lenta, observou-se três alelos. O alelo 2 teve uma migração relativa de 93 em relação ao alelo 1, que recebeu o valor 100 (alelo padrão), e o alelo três apresentou um valor de migração relativa de 86.

No loco Est-2, de migração intermediária, também foram encontrados três alelos na população estudada, sendo as migrações relativas dos alelos 2 e 3 iguais a 111 e 115, respectivamente.

O loco Est-1, o de migração mais rápida, apresentou 5 alelos, sendo seus valores de RM iguais a 103, 93, 86 e 81, para os alelos 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Este loco foi o que apresentou melhor resolução e nitidez de bandas para a espécie em estudo.

No sistema enzimático Isocitrato desidrogenase (IDH), houve o aparecimento de somente um loco (Idh-1) e os heterozigotos apresentam bandas com fenótipo heterodimérico, com valores de RM iguais a 108 para o heterozigoto de genótipo (12), 100 para o heterozigoto (23), 93 para os heterozigotos (13) e (24), 86 para o heterozigoto (14) e 79 para o heterozigoto (34). Os valores de RM foram de 117, 86, 72 para os alelos 2, 3, e 4, respectivamente.

b. Frequências alélicas e heterozigosidade nos quatro locos analisados

Todos os locos utilizados foram considerados polimórficos com base no critério de 95%, ou seja, em nenhum deles o alelo mais comum atingiu valores de frequência superiores a 0,95.

Na Tabela 8, estão expostos os dados relativos à frequência de cada um dos 15 alelos encontrados na população estudada, as heterozigosidades esperada e observada em cada um dos locos e as médias para a população.

c. Testes para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para verificar os desvios da panmixia, na população estudada, realizou-se um teste de qui-quadrado.

Na Tabela 9 encontram-se os valores de X^2 para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, obtidos para os quatro locos. Os genótipos foram agrupados em três classes e os valores de probabilidade foram encontrados pelo programa Biosys-1.

Os valores de qui-quadrado obtidos mostram valores não significativos para três locos, Est-2, Est-3, Idh-1. Entretanto, o loco Est-1 apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 9).

Nota-se na tabela 9 que a classe 2, onde estão agrupados os indivíduos heterozigotos compostos pelo alelo mais comum e os outros alelos, mostra um número de heterozigotos observado menor do que o esperado, nos quatro locos analisados. Estes resultados indicam estar havendo uma deficiência de heterozigotos na população e, apesar de

TABELA 8. Frequência dos 15 alelos em 4 locos isoenzimáticos, heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e número de indivíduos por loco (N) em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

LOCO	ALELO	FREQ. ALÉLICAS	H_o	H_e	N
Est-1	1	0,602	0,508	0,584	250
	2	0,048			
	3	0,056			
	4	0,094			
	5	0,200			
Est-2	1	0,591	0,452	0,500	252
	2	0,020			
	3	0,389			
Est-3	1	0,566	0,478	0,520	249
	2	0,400			
	3	0,034			
Idh-1	1	0,751	0,365	0,409	241
	2	0,025			
	3	0,141			
	4	0,083			
MÉDIA			0,451	0,503	

TABELA 9. Qui-quadrado (χ^2) para os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando o número observado (N_o) e esperado (N_e) dos genótipos agrupados em três classes para os quatro locos isoenzimáticos, em uma população natural de *B. forficata*. Piracicaba, SP, 1994

LOCO	CLASSES ¹	N_o	N_e	χ^2	GL ²	p^3
Est-1	1	100	90,601	6,156*	1	0,013
	2	101	119,798			
	3	49	39,601			
Est-2	1	93	88,099	1,632 ^{ns}	1	0,201
	2	112	121,802			
	3	47	42,099			
Est-3	1	85	79,843	1,770 ^{ns}	1	0,183
	2	112	122,313			
	3	52	46,843			
Idh-1	1	140	135,938	1,958 ^{ns}	1	0,162
	2	82	90,124			
	3	19	14,938			

- ¹ : 1 - número de homozigotos para o alelo mais comum;
 2 - número de heterozigotos entre o alelo mais comum e os alelos raros;
 3 - número de homozigotos raros e outros heterozigotos;
² : GL - graus de liberdade
³ : P - probabilidade de ajuste
 * : $p < 0,05$;
 ns: não significativo.

três locos não terem apresentado desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, esta falta de heterozigotos e a presença de um loco apresentando desvios significativos, sugerem a necessidade de realização de outros testes para confirmar a suposição de panmixia completa. Para tanto, foi realizado um teste combinando probabilidades (teste de Fisher), conforme descrito por STEEL & TORRIE (1980), que está apresentado na Tabela 10. Os resultados deste teste demonstram um valor de X^2 total de 18,94, com 8 graus de liberdade, que é significativo ao nível de 5%, levando a rejeição do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

TABELA 10. Combinação de probabilidades de teste de X^2 (teste de Fisher), para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os quatro locos identificados por eletroforese, de acordo com STEEL & TORRIE (1980). Piracicaba, SP, 1994

LOCO	Prob. (de X^2)	$-2 \ln P$	GL
Est-1	0,013	8,69	2
Est-2	0,201	3,21	2
Est-3	0,183	3,40	2
Idh-1	0,162	3,64	2
TOTAL		18,94*	8

$\ln$: $\log_e$ (logaritmo neperiano);

* : $p < 0,05$;

O teste foi aplicado conforme descrito por STEEL & TORRIE (1980), para combinar probabilidades, sendo a combinação feita através da adição dos valores de $-2\ln P$. O uso deste procedimento de combinação requer que as tabelas de critério do teste original sejam razoavelmente completas com respeito aos níveis de P e que para tal devem ser utilizadas interpolações se necessário. Esta exigência pôde ser satisfeita utilizando-se o resultado do teste de X^2 em classes, obtido através do programa Biosys-1, que fornece valores exatos de P para cada loco, permitindo a utilização deste procedimento, no qual o X^2 combinado tem $2k$ graus de liberdade, quando "k" probabilidades estão sendo combinadas. Neste caso o número de graus de liberdade foi igual a oito, pois estavam sendo combinadas probabilidades de quatro locos.

Considerando que os testes para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentaram desvios significativos, mostrando que a população estudada não é totalmente panmítica, procedeu-se então às análises para obtenção de estimativas da taxa de cruzamento.

4.3.1. Estimativa da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$)

a. Teste para o Equilíbrio de Wright (equilíbrio de endogamia)

Para a obtenção da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$), a partir do coeficiente de endogamia ($\hat{f}$), é necessário verificar a existência de Equilíbrio de endogamia na população. Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram valores de X^2 não significativos para os dois locos, o que nos leva a aceitar a hipótese de nulidade e a validade da suposição do equilíbrio de endogamia para a população em estudo. O valor de X^2 mais alto foi o da Idh-1, que foi igual a 1,857, mas não foi significativo com 2 graus de liberdade, apresentando uma probabilidade de ajuste maior que 30% de acordo com a tabela. O loco Est-1 apresentou valor de X^2 bastante reduzido, igual a 0,659 e probabilidades de ajuste em torno de 70%.

De acordo com VENCovsky (1992), nestas circunstâncias é válido estimar a taxa de fertilização cruzada aparente ($\hat{t}_a$) a partir da estimativa do coeficiente de endogamia ($\hat{f}$).

b. Estimativas de $\hat{\theta}_1$, $\hat{f}$ e $\hat{t}_a$

A estimativa do coeficiente de endogamia ($\hat{f}$) foi obtida a partir dos componentes das variâncias, conforme demonstrado na metodologia. As estimativas das variâncias entre famílias, entre indivíduos / famílias,

TABELA 11. Qui-quadrado para os desvios do Equilíbrio de Endogamia (Wright), considerando o número observado (No) e esperado (Ne) dos genótipos agrupados em classes para dois locos isoenzimáticos em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

LOCO	CLASSES ¹	No	Ne	X ²	GL	P
Est-1	1	100	98,389	0,659 ^{ns}	2	(>70)
	2	50	52,374			
	3	51	51,851			
	4	15	15,200			
	5	20	17,226			
	6	14	14,962			
Idh-1	1	140	140,791	1,857 ^{ns}	2	(>30)
	2	43	45,527			
	3	39	34,872			
	4	10	7,944			
	5	5	6,547			
	6	4	5,318			

- ¹ : 1 - homozigotos para o alelo mais frequente (A₁A₁);
 2 - heterozigotos entre os dois alelos mais frequentes (A₁A₂);
 3 - homozigotos para o segundo alelo mais frequente (A₂A₂);
 4 - heterozigotos entre o alelo mais frequente e os demais exceto o alelo 2: (A₁A₃, A₁A₄, A₁A₅);
 5 - heterozigotos entre o alelo 2 e os demais exceto o alelo 1: (A₂A₃, A₂A₄, A₂A₅);
 6 - homozigotos e heterozigotos para todos os alelos exceto o 1 e o 2: (A₃A₃, A₃A₄, A₃A₅, A₄A₄, A₄A₅, A₅A₅).

^{ns} : não significativo

entre genes/indivíduos/famílias e da variância total, para os 15 alelos dos quatro locos, estão apresentados no Apêndice 6. Estas estimativas foram obtidas conforme a metodologia apresentada por WEIR (1990a), a partir dos desdobramentos dos quadrados médios, cujos resultados são apresentados no Apêndice 2 para o loco Est-1, no Apêndice 3 para o loco Est-2, no Apêndice 4 para o loco Est-3 e no Apêndice 5 para o loco Idh-1.

As estimativas dos coeficientes de endogamia dentro da população ($\hat{f}$), de parentesco dentro das famílias ($\hat{\theta}_1$) e da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$), calculados conforme WEIR (1990a) e VENCovsky (1992), são apresentados na Tabela 12. As estimativas foram obtidas para cada alelo individualmente, para cada loco (média) e para todos os alelos dos 4 locos através das médias gerais.

O grau de parentesco dentro de famílias ($\hat{\theta}_1$), obtidos para a população de *Bauhinia forficata*, foram de 0,1318 na média por loco e de 0,1350 na média por alelo. Estes valores estão bem próximos de $1/8$ (0,1250), que é o grau de parentesco entre indivíduos de famílias de meios irmãos.

Entretanto, o loco Est-3 apresentou um valor discrepante de $\hat{\theta}_1$ (0,0501), sendo que os outros três locos mostram valores mais próximos entre si, apresentando um valor médio de $\hat{\theta}_1$ igual a 0,1659, o que indica um grau de

TABELA 12. Estimativas dos coeficientes de endogamia dentro da população ($\hat{f}$), de parentesco dentro das famílias ($\hat{\theta}_1$) e taxa de cruzamento ($\hat{t}$) calculados conforme WEIR (1990a), para 15 alelos em 4 locos isoenzimáticos em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

ALELO/LOCUS	$\hat{\theta}_1$	$\hat{f}$	$\hat{t}$
Est1/1	0,1655	0,1622	0,7209
Est1/2	0,1339	0,1361	0,7604
Est1/3	0,1290	0,0280	0,9454
Est1/4	0,1299	0,1415	0,7520
Est1/5	0,1391	0,1299	0,7701
MÉDIA	0,1477	0,1359	0,7608
Est2/1	0,1829	0,0949	0,8266
Est2/2	0,0145	-0,0154	1,0312
Est2/3	0,1957	0,1303	0,7695
MÉDIA	0,1822	0,1077	0,8056
Est3/1	0,0611	0,0906	0,8339
Est3/2	0,0427	0,0924	0,8307
Est3/3	0,0260	-0,0302	1,0623
MÉDIA	0,0501	0,0834	0,8460
Idh1/1	0,1704	0,1350	0,7622
Idh1/2	0,0234	-0,0205	1,0418
Idh1/3	0,2219	0,1734	0,7044
Idh1/4	0,1130	0,0891	0,8364
MÉDIA	0,1679	0,1288	0,7718
MÉDIA GERAL(a)	0,1318	0,1098	0,8021
MÉDIA GERAL(b)	0,1350	0,1140	0,7953

(a) média por loco ;

(b) média por alelo.

parentesco intermediário entre meios-irmãos e irmãos germanos. Este resultado é semelhante ao obtido por MORI (1993), que estimou valores médios de $\hat{\theta}_1$ de 0,1754 para *Eucalyptus grandis*, que segundo o autor é aproximadamente 1/6, ficando como intermediário entre 1/8, grau de parentesco entre meios-irmãos e 1/4, grau de parentesco entre irmãos germanos.

Um grau de parentesco ainda maior foi encontrado por MORAES (1992) em *Myracrodruon urundeuva*, sendo o valor de $\hat{\theta}_1$ igual a 0,2957, praticamente 1/3, mostrando um alto grau de parentesco entre indivíduos dentro das famílias.

MORI (1993) obteve valores de coeficientes de endogamia ($\hat{f}$) de 0,1085 em *Eucalyptus grandis*, indicando a existência de uma parcela de endogamia, o que também foi verificado em *Bauhinia forficata*, que apresentou valores de $\hat{f}$ de 0,1098 na média por loco e 0,1140 na média por alelo.

Os valores médios da taxa de cruzamento aparente ($\hat{t}_a$) obtidos através da análise de variância de WEIR (1990a), foram de 0,8021 na média por loco e 0,7953 na média por alelo. Este valor de $\hat{t}_a$ refere-se à taxa aparente de cruzamento e só é válido quando a população está em equilíbrio de endogamia, o que foi constatado na população estudada.

Valor semelhante foi obtido por MORI (1993)

para *Eucalyptus grandis*, sendo a taxa de cruzamento igual a 0,8041. O autor refere que o estudo foi realizado em um pomar de sementes, instalado a partir de clones não aparentados, e portanto a endogamia presente refere-se a autofecundação.

Em *Bauhinia forficata*, não é possível avaliar se a endogamia observada é resultante de autofecundação ou de cruzamentos entre indivíduos aparentados, somente com base nos dados obtidos a partir das análises de variância, pois trata-se de uma população natural. Portanto, foi realizada a estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$), com o intuito de verificar a ocorrência de autofecundação na população estudada e comparar as diferentes estimativas de $\hat{t}$.

4.4.2. Estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$)

A Tabela 13 mostra os resultados das taxas de cruzamento ($\hat{t}$) e seus erros padrões, obtidos pelo método de análise multiloco de RITLAND & JAIN (1981). São apresentados os resultados relativos à taxa de cruzamento dos locos individuais, e o resultado da análise multiloco envolvendo os quatro locos, sendo que os resultados de

TABELA 13. Estimativas das taxas de cruzamento para locos individuais e multiloco ($\hat{t} \pm$ erro. padrão-E.P.), estimativas das frequências alélicas do pólen e do óvulo e valores de qui-quadrado para os desvios das frequências genotípicas esperadas no modelo de RITLAND & JAIN (1981), em quatro locos isoenzimáticos. Piracicaba, SP, 1994

LOCO	ALELO	FREQ. GENICA ESTIMADA		$\hat{t} \pm$ E.P.	GL	X ²
		PÓLEN	ÓVULO			
Est-1	1	.624	.577	0.887 $\pm$ 0.067	9	9.06 ^{ns}
	2	.168	.269			
	3	.208	.154			
Est-2	1	.625	.538	0.810 $\pm$ 0.076	9	7.28 ^{ns}
	2	.326	.462			
	3	.049	.000			
Est3	1	.550	.577	1.119 $\pm$ 0.068	9	8.33 ^{ns}
	2	.409	.385			
	3	.041	.048			
Idh-1	1	.683	.769	0.849 $\pm$ 0.076	9	6.45 ^{ns}
	2	.151	.154			
	3	.166	.077			
MULTILOCO				0.982 $\pm$ 0.034		

ns : não significativo.

ambas as análises foram obtidos utilizando-se o programa MLT de RITLAND (1990).

Este método utiliza estimadores de máxima verossimilhança para obter as estimativas das taxas de cruzamento, e permite calcular o erro padrão de t_m , o que confere uma maior precisão a estimativa da taxa de cruzamento. Além disso, de acordo com RITLAND (1990), pode-se comparar as taxas de cruzamento dos locos individuais e multiloco, de modo que quando $t_m - t_s$ apresenta uma diferença positiva, indica a ocorrência de endogamia entre aparentados.

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostraram valores não significativos para os quatro locos analisados no teste de qui-quadrado de adequação ao modelo, mostrando que os dados se ajustam às suposições do modelo de cruzamento misto de RITLAND & JAIN (1981).

Deste modo, a alta taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$) obtida para *Bauhinia forficata*, de $0,982 \pm 0,034$, indica que a espécie é preferencialmente alógama, apresentando padrões similares a outras espécies arbóreas tropicais, como as estudadas por O'MALLEY & BAWA (1987); MURAWSKI et alii (1990); MURAWSKI & HAMRICK (1991).

MURAWSKI et alii (1990) avaliaram a taxa de cruzamento em *Quararibea asterolepis*, uma Bombacaceae visitada por esfingídeos e morcegos, e verificaram altas

taxas de cruzamento tanto para a média de locos individuais ($\hat{t}_s = 0,97$), como para a estimativa multiloco ($\hat{t}_m = 1,008$), sendo que as estimativas $\hat{t}_s$ dos cinco locos analisados variaram entre $0,766 \pm 0,058$ e $1,121 \pm 0,049$, mostrando uma maior variação das estimativas entre locos do que a observada em *Bauhinia forficata*, que variou de $0,810 \pm 0,076$ a $1,119 \pm 0,068$.

A ausência de diferença entre as estimativas de locos individuais e multilocos tem sido discutida por alguns autores, especialmente quando as taxas de cruzamento ($\hat{t}_m$) obtidas são baixas, indicando a ocorrência de endogamia.

MURAWSKI & HAMRICK (1992b) observaram uma taxa de cruzamento ($\hat{t}_s$ e $\hat{t}_m$) de cerca de 69% em *Ceiba pentandra*. Os autores concluem que a endogamia aparente é resultante de autofecundação e não de cruzamentos entre aparentados, devido à ausência de diferença entre as estimativas obtidas a partir da média dos locos individuais ($\hat{t}_s$) e a estimativa multiloco ($\hat{t}_m$).

Entretando, RITLAND & EL-KASSABY (1985) verificaram taxas de endogamia de 7% em uma espécie de conífera, sendo que tanto a média dos locos individuais, como a estimativa multiloco, apresentaram praticamente os mesmos resultados. Os autores realizaram uma análise de regressão para estimar a proporção de endogamia causada por

cruzamentos entre aparentados e a proporção causada por autofecundação e verificaram que a endogamia presente foi devida a cruzamentos entre aparentados.

Em *Bauhinia forficata* observou-se que a estimativa multiloco da taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$) foi de $0,982 \pm 0,034$, enquanto que a média dos locos individuais foi de 0,916, mostrando portanto uma diferença positiva entre as duas, sendo $\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,066$ que de acordo com RITLAND (1990), sugere a existência de endogamia devida a cruzamentos entre indivíduos aparentados. Este resultado está de acordo com o obtido através da análise de variância, que mostrou uma taxa de cruzamento de 0,8021 e um coeficiente de endogamia de 0,1098, indicando que a endogamia observada é, provavelmente, resultante de cruzamentos entre indivíduos aparentados.

4.5. Implicações das características da biologia reprodutiva de *Bauhinia forficata*

A existência de cruzamentos entre aparentados em *Bauhinia forficata* pode ser explicada pelo fato dos indivíduos analisados pertencerem à uma população colonizadora, que pode ter sido fundada por um número

reduzido de indivíduos, através de sementes oriundas de uma ou poucas árvores localizadas dentro da floresta e próximas à margem do fragmento.

Adicionalmente, observa-se na Tabela 7 que grande quantidade do pólen transportado, e cerca de 70% dos estigmas marcados com pó fluorescente, estão distribuídos entre 0 e 20 metros da planta marcada, e considerando que a dispersão de sementes ocorre por autocoria (a curtas distâncias), fica reforçada a possibilidade de ocorrer cruzamento entre indivíduos aparentados. Assim, existem fatores nesta espécie que podem levar à ocorrência de níveis elevados de endogamia no processo de colonização.

Entretanto, o comportamento do polinizador de *Bauhinia forficata* pode levar a cruzamentos entre indivíduos distantes (até 4,7 Km, conforme HEITHAUS & FLEMING, 1978), inclusive entre os indivíduos localizados na borda do fragmento (população estudada) e os indivíduos de dentro da floresta, resultando em altas taxas de cruzamento. Isto também é reforçado pelas observações de distâncias de fluxo de pólen, que indicam altas porcentagens de transferência de pólen à distâncias de 220 metros, verificando-se mais de 40% dos estigmas marcados na distância máxima de avaliação (Tabela 7).

Estas características do sistema reprodutivo de *Bauhinia forficata*, tais como polinizador de voo longo,

fluxo de pólen extenso e altas taxas de fecundação cruzada, indicam que a espécie é predominantemente alógama e sugerem, ainda, que pode haver uma rápida ampliação da variabilidade genética em populações recém implantadas, o que pode favorecer a ocupação de novos ambientes. Aliado a isto, a espécie também apresenta crescimento rápido, reprodução precoce (BELTRATI & PAOLI, 1989) e propagação vegetativa (RODRIGUES et alli, 1990), características que também favorecem a colonização de novas áreas.

5. CONCLUSÕES

a. A espécie *Bauhinia forficata* apresenta flores funcionalmente hermafroditas.

b. *Carollia perspicillata* apresenta comportamento de visita e distância de voo que garantem a sua eficiência como polinizador, promovendo fecundação cruzada e fluxo de pólen à longa distância em *Bauhinia forficata*.

c. A transferência de pólen à longas distâncias, além de 200 metros da planta marcada, mostra uma extensa movimentação de alelos, através dos grãos de pólen, em *Bauhinia forficata*.

d. A estimativa multiloco da taxa de cruzamento de *Bauhinia forficata* é alta ($0,982 \pm 0,034$), sendo coerente com o comportamento do polinizador e a distância de fluxo de pólen estimada na população.

e. Parte da endogamia observada na população estudada é resultante de parentesco entre as plantas genitoras.

f. Os resultados obtidos sobre a polinização, a distância de fluxo de pólen e o sistema reprodutivo de *Bauhinia forficata* mostram coerência com o comportamento de colonizadora que a espécie apresenta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDE, T.M. The influence of wind and animal pollination on variation in outcrossing rates. *Evolution*, **40**(2): 434-435, 1986.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. UFV, Viçosa-M.G., 1991. 242p.
- BAKER, H.G. Chemical aspects of the pollination biology of woody plants in the tropics. In: TOMLINSON, P.B. & ZIMMERMAN, M.H. eds. *Tropical trees as living systems*. Cambridge, Cambridge University Press, 1978, 675p.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, **28**: 85-92, 1974.
- BAWA, K.S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**: 399-422, 1990.
- BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. Morfologia, anatomia e desenvolvimento de sementes e plântulas de *Bauhinia forficata* Link. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, **49**(2): 583-590, maio, 1989.

- BERGALLO, H.G. Biologia floral e polinização de *Bauhinia bongardii* Steud na Serra dos Carajás, Pará. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 50(2): 401-405, maio, 1990.
- BENTHAM, G. Leguminosae II et III (Swartzia, Caesalpinieae, Mimoseae). In: MARTIUS, C.F.P. *Flora brasiliensis*, Monaco, C. Wolf and Fil, 1870, vol. 15, part 2.
- BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J.; JAROSZ, A.M. Isozyme analysis of plant mating systems. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S., ed. *Isozymes in plant biology*. Portland, Oregon, Dioscorides Press, 1989. cap 3, p.73-86.
- BROYLES, S.B. & WYATT, R. Effective pollen dispersal in a natural population of *Asclepias exaltata*: the influence of pollinator behavior, genetic similarity, and mating success. *The American Naturalist*, Chicago, 138(5): 1239-1249, november, 1991.
- BUZATO, S. & FRANCO, A.L.M. *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 181(3-4): 261-267, 1992.
- CAMPBELL, D.R. & WASER, N.M. Variation in pollen flow within and among population of *Ipomopsis aggregata*. *Evolution*, 43(7): 1444-1455, 1989.
- CARVALHO, C.T. de. Das visitas de morcegos às flores (Mammalia, Chiroptera). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 32(3/4): 359-377, dezembro, 1960.

- CHELIAK, W.N. & PITTEL, J.A. *Techniques for Starch gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species*. Pataya National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Information Report PI-X-42, 1984. 49p.
- CORREIA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Ministério da Agricultura, 1984. vol.5, 687p.
- COSTA, L.G.S. Estrutura e dinâmica de trecho de mata mesófila semidecídua, na Estação Ecológica de Ibicatu, Piracicaba, SP. São Paulo, 1992. 182p. (Mestrado - Instituto de Biociências - USP).
- CRESTANA, C.S.M.; DIAS, I.S.; MARIANO, G. Ecologia de polinização de *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, o jatobá. *Silvicultura*, São Paulo, 17/19: 31-37, 1983/85
- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- DEVLIN, B. & ELLSTRAND, N.C. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm patternity analysis. *Evolution*, 44(2): 248-259, 1990.
- De VRIES, P.S. *The butterflies of Costa Rica and their natural history*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press, 1987. 327p.
- EGUIARTE, L.E.; BÓRQUEZ, A.; RODRIGUEZ, J.; MARTINEZ-RAMOS, M.; SARUKHAN, J.; PIÑERO, D. Direct and indirect

estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution*, 47(1): 75-87, 1993.

ELLSTRAND, N.C. & MARSHALL, D.L. Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. *The American Naturalist*, Chicago, 126: 606-616, november, 1985.

EHRlich, P.R. & RAVEN, P.H. Differentiation of populations. Gene flow seems to be less important in speciation than the neo-Darwinians thought. *Science*, Whashington, 165: 1228-1232, September, 1969.

FAEGRI, K. & PIJL, L. van der. *The principles of pollination ecology*. London, Sin. Ass. 1979, 224p.

FENSTER, C.B. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). I. Gene dispersal. *Evolution*, 45(2): 398-409, 1991a.

FENSTER, C.B. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). II. Gene establishment. *Evolution*, 45(2): 410-422, 1991b.

FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; CUNHA, N.L.; REIS, M.S.: KAGEYAMA, P.Y. *Eletroforese de isoenzimas para espécies arbóreas - Manual de laboratório (versão 1994)*. Piracicaba, ESALQ, Departamento de Ciências Florestais, Laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Espécies Arbóreas, 1994. 23p.

FISCHER, E.A.; JIMENEZ, F.A.; SAZIMA, M. Pollination by bats in two species of Bombacaceae at the Ecological

- Station of Juréia, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, **15**(1): 67-72, 1992.
- FRANKIE, G.W. & BAKER, H.G. The importance of pollinator behavior in the reproductive biology of tropical trees. *Anales Instituto di Biologia, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, México, **45**(1):1-10, 1974.
- FUTUYMA, D.J. *Biologia Evolutiva*. 2.ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.
- GODT, M.J.W. & HAMRICK, J.L. Patterns and levels of pollen-mediated gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution*, **47**(1): 98-110, 1993.
- GRANT, V. Gene flow and the homogeneity of species populations. *Biologisches Zentralblatt*, **99**: 157-169, 1980.
- GRIBEL, R.; SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Flores pedem morcegos. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, **11**(61): 22-28, janeiro-fevereiro, 1990.
- HAMRICK, J.L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: URBANSKA, K. ed. *Differentiation patterns in higher plants*. New York, Academic Press, 1987. cap.3, p.53-67.
- HANDEL, S.N. Dynamics of gene flow in an experimental population of *Cucumis melo* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, **69**(10): 1538-1546, 1982.
- HANDEL, S.N. & MISHKIN, J.L.V. Temporal shifts in gene flow

and seed set: evidence from an experimental population of *Cucumis sativus*. *Evolution*, **38**(6): 1350-1357, 1984.

HEITHAUS, E.R. & FLEMING, T.H. Foraging movements of a frugivorous bat, *Carollia perspicillata* (Phyllostomatidae). *Ecological Monographs*, **48**: 127-143, 1978.

HEITHAUS, E.R.; FLEMING, T.H.; OPLER, P.A. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a sazonal tropical forest. *Ecology*, **56**: 841-854, 1975.

HEITHAUS, E.R.; OPLER, P.A.; BAKER, H.G. Bat activity and pollination of *Bauhinia pauletia*: plant-pollinator coevolution. *Ecology*, **55**: 412-419, 1974.

HOKCHE, O. & RAMIREZ, N. Pollination ecology of seven species of *Bauhinia* L. (Leguminosae: Caesalpçinoideae). *Annals of Missouri Botanical garden*, **77**: 559-572, 1990.

JANZEN, D.H.. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, Washington, **171**: 203-205, 1971.

JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill book company, 1940.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas. *IPEF*, Piracicaba, **35**: 7-40, abril, 1987.

KAGEYAMA, P.Y. & CASTRO, C.F.A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas

nativas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: ALTERNATIVAS PARA O DESMATAMENTO NA AMAZÔNIA. Belém, 1988. Trabalho apresentado.

KAGEYAMA, P.Y.; CASTRO, C.F.A.; CARPANEZZI, A.A. Implantação de Matas Ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, São paulo, 1989. *Anais*. Campinas, Fundação Cargill, 1989. p.130-143.

KAGEYAMA, P.Y.; REIS, A.; CARPANEZZI, A.A. Potencialidades e restrições da regeneração artificial na recuperação de áreas degradadas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, Curitiba, 1992. *Anais*. Curitiba, 1992. p.1-7.

KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analyses of techniques. *American Journal of Botany*. 77(5): 693-712, 1990.

KLEIN, R. M. Ecologia da flora e vegetação do Vale do Itajaí. *Sellowia*, Itajaí, 31: 10-164, 1979.

KOTCHETKOFF-HENRIQUEZ, O. & JOLY, C.A. Estudo florístico da Mata ciliar do Rio Passa Cinco, Serra do Itaquiri, Itirapina, SP. In: XXXIX CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, Belém, Pará, 1988. *Anais*, 1988, p.465.

LEVIN, D.A. & KERSTER, H.W. Gene flow in seed plants. In: DOBZHANSKY, T.: HECHT, M.K.: STEENE, W.D., ed. *Evolutionary Biology*, New York, Plenum Press, 1974, p.139-220.

LINHART, Y.B. & FEISINGER, P. Plant-hummingbird

interactions: effects of island size and degree of specialization on pollination. *Journal of Ecology*, **68**: 745-760, 1980.

MARTINS, P.S. Aspectos da biologia de populações de leguminosas herbáceas brasileiras. In: I COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1984. *Anais*. Piracicaba, 1984, janeiro, p.173-184.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ". *IPEF*, Piracicaba, **35**: 71-78, abril, 1987.

MATTHES, L.A.F. Composição florística, estrutura e fenologia de uma floresta residual de Planalto Paulista: Bosque dos Jequitibás (Campinas, SP). Campinas, 1980. p. (Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP).

MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler. Piracicaba, 1992. 139p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP).

MORELLATO, L.P.C. *História natural da Serra do Japi. Ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. Campinas, Ed. da UNICAMP/FAPESP, 1992. 321p.

MORI, E.S. *Variabilidade genética isoenzimática em uma população de Eucalyptus grandis Hill. ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção*. Piracicaba, 1993. 119p. (Doutorado-Escola Superior de

Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).

MURAWSKI, D.A. Floral resource variation, pollinator response, and potential pollen flow in *Psiguria warscewiczii*. *Ecology*, **68**(5): 1272-1282, 1987.

MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity*. **67**: 167-174, 1991.

MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The mating system of *Cavanillesia plantanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. *Biotropica*, **24**(1): 99-101, 1992a.

MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panama. *Journal of Heredity*, **83**: 401-404, 1992b.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B. Mating systems of two Bombacaceous trees of a neotropical moist forest. *Oecologia*, Berlin, **82**: 501-506, 1990.

O'MALLEY, D.M. & BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. *American Journal of Botany*, **74**(8): 1143-1149, 1987.

O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 2. Mating system. *Theoretical and Applied Genetics*, **76**: 929-932, 1988.

PEDRO, W.A. Estrutura de uma taxocenose de morcegos da

Reserva do Panga (Uberlândia, MG), com ênfase nas relações tróficas em Phyllostomidae (Mammalia: Chiroptera). Campinas, 1992. 110p. (Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas/UNICAMP).

PRANCE, G.T. The pollination of Amazonian plants. In: PRANCE, G.T. & LOVEJOY, T.E., eds. *Key environments: Amazônia*. London, Pergamon Press, 1985. cap.9, p.166-191.

RADFORD, A.E.; DICKSON, W.C.; MASSEY, J.R.; BELL, C.R. *Vascular plant systematics*. New York, Harper and Row Publ. 1974.

RAMIREZ, N.; SOBREVILA, C.; ENRECH, N.X.; RUIZ-ZAPATA, T. Floral biology and breeding system of *Bauhinia Benthamiana* Taub. (Leguminosae), a bat-pollinated tree in Venezuelan "llanos". *American Journal of Botany*, 71(2): 273-280, 1984.

REZENDE, M.H. Anatomia foliar comparada de duas espécies de *Bauhinia* L. (Leguminosae - Caesalpinoideae). Botucatu, 1987. 72p. (Mestrado - Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola - UNESP).

RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *The Journal of Heredity*, 81(3): 235-237, 1990.

RITLAND, K. & EL-KASSABAY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as show by an efficient multilocus model. *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 374-384, 1985.

- RITLAND, K. & JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, **47**(1): 35-52, 1981.
- RODRIGUES, R.R.; MATTHES, L.A.F.; TORRES, B.B. Espécies arbóreas - Distribuição agregada ou reprodução vegetativa? In: V CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BOTÂNICA, Havana, 1990. *Anales*. Havana, 1990. p.54.
- SAZIMA, I. Observations on the feeding habits of phyllostomatid bats (*Carollia*, *Anoura* and *Vampyrops*) in Southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, **57**(2): 381-382, may, 1976.
- SAZIMA, M. & SAZIMA, I. Quiropterofia em *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae), na Serra do Cipó, Minas Gerais. *Ciência e Cultura*, **27**(4): 405-416, 1975.
- SAZIMA, M. & SAZIMA, I. Bat pollination of the Passion flower, *Passiflora mucronata* in Southeastern Brazil. *Biotropica*, **10**(2): 100-109, 1978.
- SCHACHT, W.H.; LONG, J.N.; GOBENA, A. Aboveground biomass accumulation in coppicing woodland, northeast Brazil. *Forest Ecology and Management*, **55**: 201-208, 1992.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, **39**(1): 53-65, 1985.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.L. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, **73**(1): 9-26,

1983.

STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics*, 2^a ed.. New York, McGraw Hill, 1980, p.475.

STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. *Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.)*. North Carolina, North Carolina University, 1988, 87p. Technical Bulletin 286.

SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. *A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics*. Illinois, Release 1.7. Swofford, D.L. 1989. Natural History Survey. 43p.

THOMSON, J.D. & THOMSON, B.A. Dispersal of *Erythronium grandiflorum* pollen by bumblebees: implications for gene flow and reproductive success. *Evolution*, **43**(3): 657-661, 1989.

VAZ, A.M.S.F. Considerações sobre a taxonomia do gênero *Bauhinia* L. Sect. *Tylotaea* Vogel (Leguminosae-Caesalpinoideae) do Brasil. *Rodriguesia*, **XXXI**(51) 127-234, 1979.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE GENÉTICA, 10, Rio de Janeiro, 1992. *Proceedings, Revista Brasileira de Genética*. Suplemento 1, Ribeirão Preto, **15**(1): 53-60, 1992.

VOGEL, S. Ecophysiology of zoophyllic pollination. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H.

eds. *Physiology plant ecology III*. Berlin, Springer-Verlag, 1963. p.560-624.

WASER, N.M. & PRICE, M.V. A comparison of pollen and fluorescent dye carry-over by natural pollinators of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *Ecology*, **63**(4): 1168-1172, august, 1982.

WEBB, C.J. & BAWA, K.S. Pollen dispersal by hummingbirds and butterflies: a compative study of two lowland tropical plants. *Evolution*, **37**(6): 1258-1270, 1983.

WEIR, B.S. *Genetic data analyses. Methods for discrete population genetic data*. North Cartolina State University, Sinauer Associates Inc. Publishers, Suderland, Massachusetts, 1990a. 377p.

WEIR, B.S. Intraspecific differentiation. In: HILLIS, D.M. & MORITZ, C. *Molecular Systematics*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Pub. 1990b. cap.10, p.373-405.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. *American naturalist*, **56**: 330-338, 1922.

ZEISLER, M. Uber die Abgrenzung der eigentlichen Narbenflche mit Hilfe Reaktionen. *Beih. Bot. Zbl.*, **58**: 308-318, 1938.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Número médio de pólen marcado por estigma (X) e número de estigmas analisados (N), em seis classes de distância e sete repetições em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

CLASSES DE DISTANCIA (m)		REPETIÇÕES						
		1	2	3	4	5	6	7
0-10	N	20	20	16	5	15	9	17
	X	2.75	4.30	2.37	5.20	3.93	11.78	2.23
		(2.31)	(3.42)	(4.15)	(6.42)	(7.87)	(10.92)	(2.54)
10-20	N	20	20	22	12	18	20	16
	X	2.85	7.35	0.23	1.25	1.50	6.30	2.19
		(2.32)	(5.46)	(0.43)	(1.42)	(1.76)	(7.04)	(3.12)
20-40	N	30	20	20	4	15	16	10
	X	0.47	5.15	0.55	3.00	3.60	6.44	1.10
		(0.78)	(4.08)	(0.69)	(3.83)	(11.09)	(12.64)	(1.29)
40-80	N	22	30	20	5	20	11	20
	X	0.59	1.30	1.20	1.40	0.65	1.18	2.45
		(1.44)	(1.39)	(1.91)	(3.13)	(2.03)	(0.98)	(5.15)
80-120	N	-	20	22	-	2	2	1
	X	-	1.35	0.59	-	0.0	1.0	0.0
		-	(1.42)	(1.14)	-	(0.0)	(0.0)	(0.0)
120-220	N	50	30	10	2	-	1	-
	X	0.48	2.07	1.90	0.0	-	6.0	-
		(1.25)	(2.53)	(0.74)	(0.0)	-	(0.0)	-

Obs: Os valores entre parenteses correspondem ao desvio padrão.

APÊNDICE 2. Quadrados médios entre famílias, indivíduos/família, genes/indivíduo/família no modelo hierárquico desbalanceado para cinco alelos do loco Est-1 identificados por eletroforese em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

F.V.	G.L.	ALELOS				
		1	2	3	4	5
Famílias	12	1,7536	0,2798	0,3070	0,5073	1,0119
Indivíduos	237	0,2023	0,0400	0,0411	0,0759	0,1390
Genes	250	0,2040	0,0400	0,0520	0,0740	0,1420

APÊNDICE 3. Quadrados médios entre famílias, indivíduos/família, genes/indivíduo/família no modelo hierárquico desbalanceado para três alelos do loco Est-2 identificados por eletroforese em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

F.V.	G.L.	ALELOS		
		1	2	3
Famílias	12	1,9184	0,0294	2,0056
Indivíduos	239	0,1790	0,0186	0,1787
Genes	252	0,2222	0,0198	0,2103

APENDICE 4. Quadrados médios entre famílias, indivíduos/família, genes/indivíduo/família no modelo hierárquico desbalanceado para três alelos do loco Est-3 identificados por eletroforese em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

F.V.	G.L.	ALELOS		
		1	2	3
Famílias	12	0,8166	0,6357	0,0634
Indivíduos	236	0,2395	0,2430	0,0303
Genes	249	0,2249	0,2189	0,0341

APÊNDICE 5. Quadrados médios entre famílias, indivíduos/família, genes/indivíduo/família no modelo hierárquico desbalanceado para quatro alelos do loco Idh-1 identificados por eletroforese em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994

F.V.	G.L.	ALELOS			
		1	2	3	4
Famílias	12	1,3641	0,0438	1,1476	0,3811
Indivíduos	228	0,1524	0,0227	0,0933	0,0648
Genes	241	0,1660	0,0249	0,1058	0,0685

APENDICE 6. Estimativas das variâncias entre famílias (σ_F^2), entre indivíduos/família (σ_I^2), entre genes/indivíduos/família (σ_G^2) e da variância total (σ_T^2) para os 15 alelos dos quatro locos isoenzimáticos em uma população natural de *Bauhinia forficata*. Piracicaba, SP, 1994.

LOCO	ALELO	σ_F^2	σ_I^2	σ_G^2	σ_T^2
Est-1	1	0,0403	-0,0008	0,2040	0,2435
	2	0,0062	$2,2 \cdot 10^{-5}$	0,0400	0,0463
	3	0,0069	-0,0054	0,0520	0,0535
	4	0,0112	$9,6 \cdot 10^{-4}$	0,0740	0,0862
	5	0,0227	0,0015	0,1420	0,1632
	M	0,0175	-0,0013	0,1024	0,1185
Est-2	1	0,0449	-0,0216	0,2222	0,2455
	2	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$-6,1 \cdot 10^{-4}$	0,0198	0,0195
	3	0,0473	-0,0158	0,2103	0,2418
	M	0,0308	-0,0127	0,1508	0,1690
Est-3	1	0,0151	0,0073	0,2249	0,2473
	2	0,0103	0,0121	0,2189	0,2412
	3	$8,6 \cdot 10^{-4}$	-0,0019	0,0341	0,0331
	M	0,0087	0,0058	0,1593	0,1738
Idh-1	1	0,0327	-0,0068	0,1660	0,1919
	2	$5,7 \cdot 10^{-4}$	-0,0011	0,0249	0,0244
	3	0,0284	-0,0063	0,1058	0,1280
	4	0,0085	-0,0018	0,0685	0,0752
	M	0,0176	-0,0040	0,0913	0,1048
MÉDIA GERAL(a)		0,0187	-0,0031	0,1263	0,1419
MÉDIA GERAL(b)		0,0184	-0,0029	0,1208	0,1363

(a): Média por loco;

(b): Média por alelo.